



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster

Aislamiento y caracterización de fracciones y proteínas lácteas  
con actividad antibacteriana

Isolation and characterization of milk fractions and proteins with  
antibacterial activity

**Autor**

Arturo Blázquez Soro

**Director**

M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Paniagua

Facultad de Veterinaria

Curso 2017/2018

---

## **Agradecimientos**

Este Trabajo de Fin de Máster no se habría llevado a cabo sin el asesoramiento, la paciencia y la disposición de mi tutora M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Paniagua. Además, he de agradecer a los demás profesores del grupo y departamento por su apoyo y acogida. Por otro lado, a todos los profesores que me han impartido clase durante estos años en el grado y en el máster, he aprendido mucho y os lo agradeceré en el futuro.

También, he de destacar y agradecer notablemente la ayuda y apoyo de mis compañeros del Grupo de Leche en todos estos años de convivencia. En especial, a Miriam Esteban por ser la proveedora principal de placas de cultivo y por sus conocimientos de biología molecular (y por aguantarme). A Andrea Sangüesa por no rendirse con los ensayos y por la alegría que desprende. A Iolanda Nicolau y Álvaro Doblas por ser muy buenos compañeros de laboratorio y por los viajes que hemos hecho juntos y que haremos. A María Corredera por ser la técnico oficial de nuestro laboratorio y por su manera de pensar tan interesante.

Por último, a mi familia (a mi madre Cristina y a mi hermana Irene), a mis amigos del pueblo, de la carrera, del máster y del laboratorio. Y a Pilar, sin la cual no habría sido lo mismo y con la que deseo recorrer un largo camino a su lado.

Todas estas personas me han motivado y apoyado a seguir mi carrera de investigador y les estoy muy agradecido. Espero devolvérselo en un futuro.

# Índice

<b>1. Resumen/Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>3</b>
2.1 Leche: composición y estructura .....	3
2.2 Glóbulo graso y proteínas de membrana .....	5
2.3 Proteínas lácteas bioactivas .....	7
2.4 <i>Cronobacter sakazakii</i> como patógeno .....	11
<b>3. Justificación y objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>4. Materiales y métodos.....</b>	<b>14</b>
4.1 Aislamiento de las fracciones y proteínas lácteas .....	14
4.1.1 Aislamiento y caracterización de las fracciones lácteas .....	14
4.1.2 Aislamiento de mucinas .....	14
4.1.3 Aislamiento de una fracción enriquecida en lactadherina .....	14
4.2 Técnicas electroforéticas.....	14
4.2.1 Preparación de geles de poliacrilamida .....	14
4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y técnicas de tinción .....	16
4.3 Determinación de la concentración de proteína .....	14
4.4 Cultivo celular .....	14
4.4.1 Siembra y mantenimiento del cultivo celular.....	14
4.4.2 Congelación y descongelación de células .....	14
4.4.3 Cultivo de las células Caco-2 en placas de 96, 24 y 6 pocillos .....	14
4.5 Cultivo de <i>Cronobacter sakazii</i> .....	14
4.6 Preparación de lactoferrina bovina nativa.....	14
4.7 Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i> .....	14
4.8 Ensayos de inhibición de la adhesión bacteriana .....	14
4.9 Determinación de la citotoxicidad .....	14

4.10 Determinación del estrés oxidativo .....	14
4.11 Expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 mediante RT-PCR .....	14
4.12 Análisis estadístico de los resultados.....	14
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>23</b>
5.1 Aislamiento de las fracciones y proteínas lácteas.....	23
5.1.1 Aislamiento y caracterización de las fracciones lácteas .....	14
5.1.2 Aislamiento de mucinas .....	14
5.1.3 Aislamiento de una fracción enriquecida en lactadherina .....	14
5.2 Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i> .....	25
5.3 Ensayos de inhibición de la adhesión bacteriana.....	26
5.4 Determinación de la citotoxicidad .....	28
5.5 Determinación del estrés oxidativo.....	29
5.6 Expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 mediante RT-PCR .....	31
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>34</b>
<b>7. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>35</b>

## 1. Resumen/Abstract

La leche presenta compuestos activos a los que se le atribuyen propiedades funcionales y terapéuticas. Entre estas proteínas funcionales, destacan las proteínas del lactosuero, como la lactoferrina, y algunas proteínas de la membrana del glóbulo graso (MFGM), como la lactadherina y las mucinas. El patógeno emergente *Cronobacter sakazakii* se ha asociado a graves infecciones en la población infantil al ser las fórmulas infantiles en polvo una fuente de transmisión. Así, la adición de proteínas bioactivas en las fórmulas infantiles es necesaria para reducir el riesgo de infección por agentes patógenos, contribuyendo a regular la defensa intestinal. El objetivo de este trabajo ha sido el aislamiento de fracciones y proteínas lácteas con actividad defensiva y la evaluación de su actividad antimicrobiana frente al patógeno *C. sakazakii*, utilizando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Para este fin, se aislaron fracciones (lactosuero, mazada o buttermilk y butterserum) y proteínas de leche de vaca (lactadherina y mucinas) y se evaluó, junto con la lactoferrina bovina comercial, su actividad antimicrobiana frente al patógeno *C. sakazakii* y su capacidad de inhibición de su adhesión a la línea celular Caco-2. Además, se analizó la viabilidad y estrés oxidativo de la línea celular Caco-2, así como la activación de vías de señalización de los receptores tipo Toll (TLRs) 2 y 4, en presencia de dicho agente patógeno.

Milk has active compounds that are characterised by having functional and therapeutic properties. Whey proteins like lactoferrin and the milk fat globule membrane (MFGM) proteins, such as lactadherin and mucins, are among them. The emergent pathogen *Cronobacter sakazakii* has been associated to severe infections in the infant population, being powdered infant formula a source of transmission. Thus, the addition of bioactive proteins to infant formula is necessary to reduce the risk of infection by pathogen agents, helping regulate the intestinal barrier. The aim of this project has been the isolation of cow milk fractions (whey, buttermilk and butter serum) and proteins (lactadherin and mucins) with defensive activity and the evaluation of its antimicrobial properties against the pathogen *C. sakazakii*, using the cellular line Caco-2 as a model of intestinal epithelium. Hence, milk fractions and proteins (lactadherin and mucins) were isolated and evaluated, along with commercial bovine lactoferrin, against *C. sakazakii* to test its antimicrobial and antiadhesive properties using the cellular line Caco-2. Furthermore, the viability and oxidative stress of said cellular line was studied, as well as the activation of signaling pathways of Toll like receptors (TLRs) 2 and 4.

## 2. Introducción

### 2.1 Leche: composición y estructura

Según el Codex Alimentarius (1999), la **leche** se define como la secreción mamaria de hembras de abasto obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción y destinada al consumo humano. Sin embargo, el Reglamento (CE) N° 853/2004 destaca el término de **leche cruda** como leche que no haya sido calentada a una temperatura superior de 40 °C o haya sufrido un tratamiento equivalente.

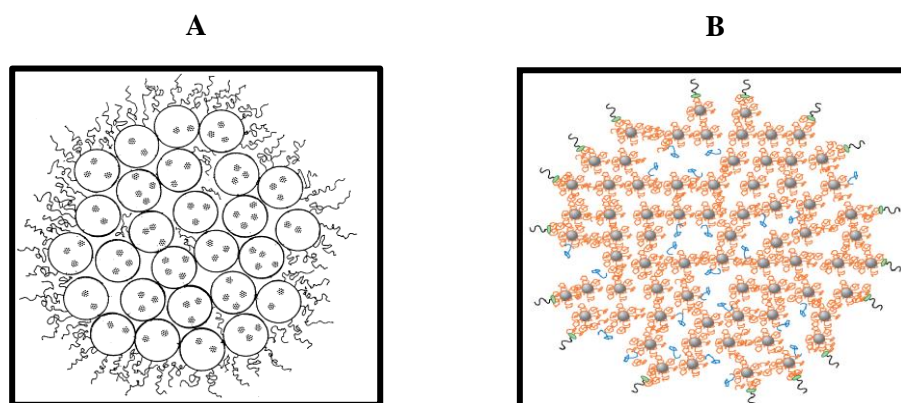
La leche presenta la función natural de alimentar y proveer a la cría de componentes necesarios para su crecimiento y desarrollo. Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche se caracteriza por ser un producto complejo debido a que consiste en una mezcla homogénea de sustancias en emulsión, suspensión y disolución. Los lípidos se encuentran en emulsión, en forma de glóbulos grasos recubiertos de una membrana, constituyendo los componentes con mayor tamaño de la leche, con un diámetro de partícula de 0,1-10 µm. Con un menor diámetro de partícula, de 20-300 nm, se encuentran las caseínas, las proteínas más abundantes de la leche, que forman unas estructuras denominadas micelas y se encuentran en dispersión coloidal. Los componentes más pequeños (3-10 nm) como la lactosa, algunas proteínas y lípidos, ácidos orgánicos, enzimas y la mayoría de los minerales y las vitaminas de la leche se encuentran en el suero en solución formando la fase denominada lactosuero (Walstra *et al.*, 2006; Haug, Høstmark y Høstard, 2007).

El componente más abundante de la leche es la lactosa, disacárido formado por la unión de una molécula de glucosa con una de galactosa, constituyendo el 4,5-5% en la leche bovina. La siguiente sustancia más abundante en la leche es la grasa, cuya proporción puede variar del 3 al 5%, siendo los triglicéridos el principal constituyente de la misma al representar el 95% de la grasa de la leche. Las proteínas de la leche constituyen el 3-3,3% y se encuentran divididas en dos grupos, según su solubilidad al reducir el pH de la leche por debajo de 4,6 (Fox y Kelly, 2007). Las caseínas representan el 75% de las proteínas de la leche y son insolubles, precipitando o gelificando según se produzca una disminución rápida o lenta del pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico de 4,6. Por otro lado, las proteínas del lactosuero son estables y solubles a pH 4,6 y constituyen el 19% del total de las proteínas. El resto de proteínas aparecen infiltradas en la membrana del glóbulo graso. En menor proporción, la leche contiene sales minerales asociadas a las

micelas de caseína y disueltas en el lactosuero, en forma ionizada y no ionizada. Además, existen otros componentes nombrados anteriormente, como vitaminas, enzimas y ácidos orgánicos (Kelly, 2010).

La principal función de las **micelas** es estabilizar las caseínas en el lactosuero y transportar las sales minerales de calcio y fosfato. Además, las micelas son las responsables del color blanco de la leche al producir la difracción de la luz. En la leche de vaca, las caseínas se dividen en cuatro tipos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  y se encuentran en una proporción 4:1:3,5:1,5, respectivamente. La localización de los tipos de caseína en las micelas es distinta debido a su solubilidad y tamaño, encontrándose la  $\kappa$ -caseína en la superficie, la  $\beta$ -caseína en el interior y las  $\alpha$ -caseínas a través de la estructura micelar. Las  $\alpha$  y  $\beta$ -caseínas al estar fosforiladas en los residuos de serina son capaces de unirse al fosfato de calcio formando puentes que estabilizan el complejo. La estructura de las micelas ha sido estudiada por diversos autores, proponiendo diferentes modelos de la disposición de los componentes que la forman. Los modelos micelares propuestos con más relevancia son los modelos submicelar y “nanoclusters” (Farrel *et al.*, 2006; Dalglish y Corredig, 2012).

La **hipótesis submicelar** es el modelo más aceptado y se basa en la formación de las micelas por agregados denominados submicelas unidos por puentes de fosfato de calcio y por interacciones hidrofóbicas (Fig. 1A). Las uniones individuales entre las caseínas consisten en interacciones hidrofóbicas. Además, la distribución no uniforme de la  $\kappa$ -caseína en las submicelas permite una mayor cantidad de calcio en las submicelas interiores y que las submicelas con alto contenido en  $\kappa$ -caseína se encuentren en la superficie, reforzando la estabilidad de la estructura al exponer el dominio polar hacia el exterior. Por otro lado, se ha descrito el **modelo de nanoclusters** (Fig. 1B). Este modelo se encuentra basado en la formación espontánea de nanoclusters de fosfato cálcico en presencia del dominio polar de la  $\beta$ -caseína. Las micelas consistirían en una matriz homogénea de proteínas distribuidas aleatoriamente por nanoclusters de fosfato cálcico. Los complejos de fosfato cálcico se estabilizarían por ligandos de los dominios polares de las caseínas sensibles al calcio (Swaisgood, 2010).



**Figura 1.** (A) Modelo de submicelas o submicelar de una micela de caseína, donde los círculos representan las submicelas de caseína, las líneas en forma de muelle los dominios polares de las  $\kappa$ -caseínas y las manchas grises el fosfato cálcico coloidal (Walstra, 1999).

(B) Modelo de nanoclusters con esferas (en gris) de nanoclusters de fosfato cálcico. Las líneas naranjas enrolladas representarían las  $\alpha$  y  $\beta$ -caseínas, las líneas azules las uniones hidrofóbicas de  $\beta$ -caseínas con otras caseínas, los círculos verdes las  $\kappa$ -caseínas y las líneas negras los dominios polares de las  $\kappa$ -caseínas (Dalglish y Corredig, 2012).

El **lactosuero** está formado por una variedad de proteínas globulares hidrosolubles. Entre estas proteínas destacan la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina sérica bovina (BSA), la lactoferrina (LF) y la lactoperoxidasa (O'Regan, Ennis y Mulvihill, 2009).

La  **$\beta$ -lactoglobulina** es la proteína más abundante en el lactosuero de vaca, con una concentración de 2-4 g/L en la leche madura. Esta proteína se caracteriza por su estructura en forma de cáliz con una cavidad en el interior y una alta proporción de residuos hidrofóbicos, que le confieren la capacidad de unir componentes de bajo peso molecular como el retinol y los ácidos grasos (Boland, 2009).

La  **$\alpha$ -lactalbúmina**, con una concentración de 1-1,5 g/L en la leche madura, es la segunda proteína en cantidad en el lactosuero de vaca, responsable de la síntesis de lactosa al formar parte de la galactosil transferasa mamaria. La estructura de esta proteína presenta puentes disulfuro y átomos de calcio, que favorecen la renaturalización de la misma al ser sometida al calor (Boland, 2009).

Las **inmunoglobulinas** están presentes en altas concentraciones en el calostro (60 g/L), la secreción generada en los primeros días de lactación, concentración que desciende en la leche madura a 0,5 g/L. La función de estas proteínas es defensiva, destacando su



estructura característica constituida por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por puentes disulfuro (Boland, 2009).

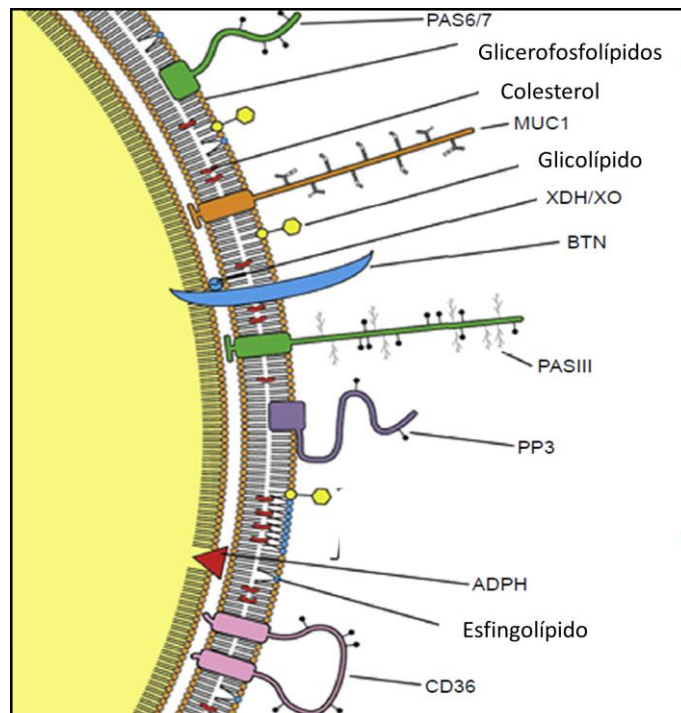
La **albúmina sérica bovina** se encuentra en la leche en una cantidad de alrededor de 0,4 g/L. La propiedad más relevante de esta proteína es su capacidad de unión a la  $\beta$ -lactoglobulina y a otras moléculas de bajo peso molecular debido a que presenta varios puentes disulfuro (Madureira *et al.*, 2007).

La **lactoferrina** y la **lactoperoxidasa** se encuentran en el lactosuero en una cantidad de 0,1 y 0,03 g/L, respectivamente. Aunque ambas proteínas están relacionadas con la actividad antibacteriana, la lactoferrina destaca por sus propiedades bacteriostáticas y bactericidas (Madureira *et al.*, 2007).

## 2.2 Glóbulo graso y proteínas de membrana

La grasa de la leche se distribuye en forma de emulsión, como se ha descrito anteriormente. Los glóbulos grasos están recubiertos de una membrana compleja que presenta distintas capas denominada **membrana del glóbulo graso de la leche** (MFGM, del término en inglés *milk fat globule membrane*). Esta membrana actúa como emulsificante previniendo la floculación y coalescencia de los glóbulos grasos y como barrera evitando la acción de las lipasas en la grasa de la leche (Singh, 2006).

Los **lípidos** de la leche mayoritariamente son triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga aunque hay pequeñas cantidades de monoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres. Los triglicéridos son responsables de los procesos de cristalización, punto de fusión y propiedades reológicas de los glóbulos grasos. Al ser apolares, estos lípidos se sitúan en el núcleo del glóbulo graso y se recubren de componentes bipolares como fosfolípidos, proteínas, colesterol, enzimas y carbohidratos. De esta manera, la membrana del glóbulo graso está formada por tres capas (Fig. 2): Una primera capa en el interior constituida por lípidos polares y proteínas, una capa intermedia proteica y una bicapa externa compuesta por enzimas, proteínas, glicoproteínas, lípidos polares y no polares y fosfolípidos que recubre todo el glóbulo graso (Smoczyński, Staniewski y Kiełczewska; 2012).



**Figura 2.** Esquema de la distribución de los lípidos y proteínas de la MFGM (Gallier, Laubscher y Jiménez-Flores, 2014).

Entre las **proteínas** presentes en la membrana del glóbulo graso destacan la butirofilina (BTN); las mucinas como la MUC1, MUC15 (PAS III) y MUCX; la lactadherina (PAS 6/7); el grupo de diferenciación 36 (CD36); la adipofilina (ADPH); la xantina deshidrogenasa/oxidasa (XDH/XO) y la proteasa peptona 3 (PP3). Las proteínas más abundantes de la membrana del glóbulo graso son la butirofilina y la xantina deshidrogenasa/oxidasa que representan un 70 y 20-21% del total de proteínas, respectivamente. Las demás proteínas mencionadas anteriormente representan menos del 10% del total (Spitsberg, 2005).

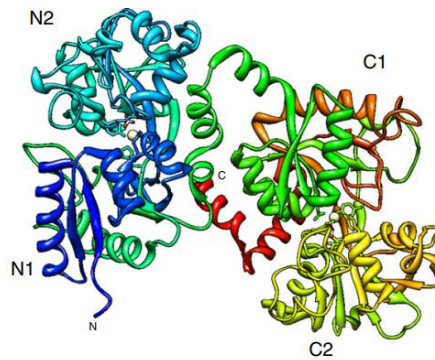
La posición de estas proteínas en la membrana es asimétrica y variable según la proteína (Fig. 2). La ADPH se encuentra situada en la capa más interna debido a su afinidad por los triglicéridos, junto a la XDH/XO, posicionada en el interior de la monocapa. La BTN es una proteína transmembrana de la capa más externa de la membrana que está interconectada con la XDH/XO. Estas tres proteínas forman un complejo supramolecular conectando el interior con el exterior de la membrana que estabiliza su estructura. Algunas proteínas como la PAS 6/7 y la PP3 se sitúan en la capa bilipídica del exterior y otras como el CD36, la MUC1 y la MUC15 ocupan gran parte de la membrana sin atravesarla completamente (Dewettinck *et al.* 2008).

Las funciones que se le atribuyen a las proteínas de la membrana del glóbulo graso son numerosas y algunas de ellas se encuentran relacionadas con la síntesis de proteínas, el transporte, la señalización celular y el metabolismo. Estas funciones se vinculan con el grado de glicosilación de las proteínas, siendo elevado en la mayoría de ellas. Las glicoproteínas de la membrana del glóbulo graso han sido estudiadas por diversos autores, siendo las de mayor grado de glicosilación las que presentan propiedades beneficiosas para la salud humana (Ross *et al.*, 2015).

### 2.3 Proteínas lácteas bioactivas

Las proteínas lácteas suministradas al recién nacido presentan funciones nutritivas y bioactivas que han sido investigadas debido al beneficio que suponen para su desarrollo. Las proteínas con características nutritivas se encuentran en la leche en una cantidad y calidad idóneas ayudando al crecimiento y desarrollo del infante. Estas proteínas son absorbidas total o parcialmente por el recién nacido. Por otro lado, se ha demostrado en numerosos estudios que las proteínas con propiedades funcionales o bioactivas, no absorbidas en el intestino, reducen la morbilidad y los procesos de infección en el niño. En esta revisión nos centraremos en la relevancia de las proteínas bioactivas de la leche (Haschke, Haiden y Thakkar, 2016).

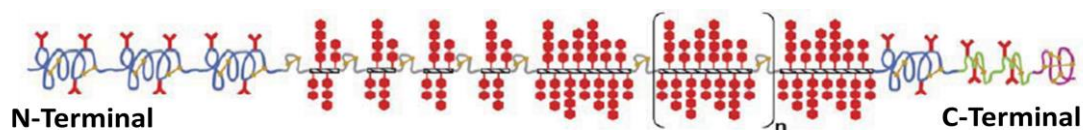
La **lactoferrina** es una glicoproteína de la familia de las transferrinas presente en la mayoría de las secreciones externas de los mamíferos, con capacidad de unir al hierro inorgánico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) y orgánico ( $\text{Fe}^{+2}$ ) y otros iones como el cobre, zinc o magnesio. Esta proteína tiene un peso molecular de 80 kDa y se encuentra formada por dos lóbulos que contienen dos dominios capaces de quelar un ión de hierro cada uno de ellos (Fig. 3). Así, una molécula de lactoferrina es capaz de unir dos iones hierro. Además, esta glicoproteína, según la saturación del hierro, puede encontrarse en tres formas: apolactoferrina (sin hierro unido), forma monoférrica (con un ión férrico unido) y hololactoferrina (con dos iones férricos). La molécula de lactoferrina al ser una glicoproteína presenta sitios de glicosilación situados en su mayoría en la superficie. Los glicanos unidos a la lactoferrina, además de contribuir a sus propiedades bioactivas, hacen que esta molécula sea resistente a las proteasas y al pH bajo (Adlerova, Bartoskova y Faldyna, 2008).



**Figura 3.** Estructura cristalina de la lactoferrina bovina con los 4 dominios polipeptídicos (N2, N1, C1 y C2) diferenciados en dos lóbulos (García-Montoya *et al.*, 2012).

Las propiedades que se le atribuyen a la lactoferrina son numerosas, como una actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y anticarcinogénica, entre otras. La actividad antimicrobiana de la lactoferrina afecta tanto a bacterias Gram – como Gram +. Así, esta glicoproteína produce un efecto bacteriostático al captar el ión  $\text{Fe}^{3+}$  y limitar su uso como nutriente, y un efecto bactericida al interaccionar, de manera indirecta, los sitios de glicosilación de la molécula con los lipopolisacáridos (LPS) de la superficie de las bacterias, alterando así la permeabilidad de sus membranas. Además, se le atribuyen efectos antifúngicos, antivíricos y antiparasitarios. Por otro lado, la lactoferrina se ha relacionado con la reducción de infecciones intestinales, fenómenos inflamatorios, la promoción de efectos inmunomoduladores y la capacidad de producir la apoptosis de células cancerosas (González-Chávez, Arévalo-Gallegos y Rascón-Cruz, 2009).

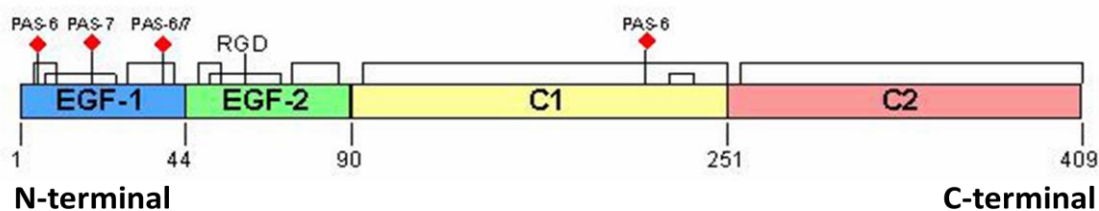
Las **mucinas** son una familia de glicoproteínas, alargadas y altamente glicosiladas, entre las que se encuentra la MUC15, MUC1 y MUCX con pesos moleculares de 95, 160-200 y >200 kDa, respectivamente (Liu, Erickson y Henning, 2005). La estructura de estas proteínas está constituida por una cadena de un número variable de aminoácidos repetidos en tándem. La cadena suele presentar un dominio con una región N-terminal muy glicosilada situada en la parte externa y una región C-terminal que sirve de anclaje en la MFGM (Fig. 4). Entre las mucinas, existen diferencias en el grado de glicosilación y el tipo de oligosacáridos que forman sus estructuras (O’Riordan *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Esquema de la estructura de una mucina del extremo N-terminal al C-terminal. Los oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación se representan en rojo y la cadena de aminoácidos en diferentes colores (Bansil y Turner, 2006).

Las mucinas se han identificado como agentes protectores frente a infecciones bacterianas y víricas como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, rotavirus y virus de Norwalk. El mecanismo de estas glicoproteínas consiste en bloquear, mediante los numerosos sitios de glicosilación que poseen, a los microorganismos para inhibir su adhesión e invasión de las células humanas. Sin embargo, la mayoría de estudios que se han realizado son experimentos *in vitro*, y para corroborarlo sería necesario trasladarlo a ensayos *in vivo* para demostrar la eficacia de la acción de las mucinas (Ross *et al.*, 2015).

La **lactadherina** es una glicoproteína formada por dos variantes de glicosilación conocidas como PAS-6 y 7 con un peso molecular de 50 y 47 kDa, respectivamente, y presente en la membrana del glóbulo graso. La estructura de esta proteína se encuentra formada por un dominio homólogo del factor de crecimiento epidérmico (EGF, del término en inglés *Epidermal Growth Factor*) situado cerca del extremo N-terminal y que presenta la mayoría de los sitios de glicosilación de la proteína. Además, presenta un dominio C homólogo de los factores de coagulación VIII y V, situado cerca del extremo C-terminal y que se une a los fosfolípidos de la MFGM (Fig. 5) (Shi *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Representación esquemática de las características estructurales de la lactadherina. Los sitios de glicosilación se representan con rombos rojos y las distintas partes que forman la cadena de lactadherina dominio EGF-1 y 2 (azul y verde) y dominio C1 y 2 (amarillo y rosa) (Hvarregaard *et al.*, 1996).

La mayoría de estudios de bioactividad de la lactadherina se basan en la inhibición de la replicación de rotavirus al unirse específicamente sus sitios de glicosilación a las proteínas de la superficie del virus. Por otro lado, el dominio C parece presentar efectos anticoagulantes que pueden evitar el desarrollo de enfermedades procoagulantes como la sepsis. Esta proteína actúa en las células intestinales dañadas promoviendo la regeneración de las mismas (Liu y Newburg, 2013).

En la literatura científica, aparecen otras proteínas con propiedades beneficiosas como la butirofilina, lisozima, xantina oxidasa y péptidos que derivan de otras proteínas como el componente 3 de la proteosa peptona 3 (PP3) o el glicomacropéptido, presente en la  $\kappa$ -caseína. La butirofilina parece atenuar o inhibir la encefalomiелitis autoinmune relacionada con la esclerosis múltiple humana. La lisozima y la xantina oxidasa actúan como antibacterianas junto con otros componentes ajenos a su estructura. Por último, los péptidos producidos en procesos de fermentación, hidrólisis y/o digestión parecen relacionarse con actividades antimicrobianas, antioxidantes, antihipertensivas, inmunomoduladoras y opioides (Spitsberg, 2005; Park y Nam, 2015).

En la actualidad, la industria láctea todavía desecha una gran parte de los subproductos derivados del queso, mantequilla o leche. Estos subproductos están compuestos principalmente por fracciones del lactosuero que se producen en una cantidad de 9 kg por kg de queso y fracciones de mazada que se producen en un volumen de 10 millones de toneladas a nivel mundial. El lactosuero se consigue tras la separación de las caseínas en el proceso de elaboración del queso. Por otro lado, la mazada (o buttermilk) es la fase acuosa liberada tras realizar el batido de la nata en el proceso de formación de la mantequilla. Además, aparece otro subproducto obtenido en el proceso de obtención de la grasa láctea anhidra (AMF, del término en inglés *anhydrous milk fat*) al fundir la mantequilla o al concentrar la grasa de la nata que se denomina butter serum. Estas fracciones son ricas en las proteínas bioactivas descritas, como la lactoferrina en el lactosuero y las proteínas de la MFGM en el buttermilk y butter serum. Según la literatura científica, estas fracciones presentan propiedades beneficiosas para la salud al ser antioxidantes, inhibidores de la adhesión de patógenos y antivíricas. Así, estos subproductos de la industria láctea podrían revalorizarse y destinarse al consumo humano (Madureira *et al.*, 2007; Vanderghem *et al.*, 2010; Hansen y Cheong, 2013).

## **2.4 *Cronobacter sakazakii* como patógeno**

El género *Cronobacter*, antes conocido como *Enterobacter sakazakii*, pertenece a la familia Enterobacteriaceae y comprende siete especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis* y *C. universalis* y *C. condimenti*. Este género de bacilos Gram – se caracteriza por ser anaerobio facultativo con motilidad peritrica. En los últimos años, el género *Cronobacter*, en concreto la especie *C. sakazakii*, está suponiendo un problema para la industria alimentaria. La naturaleza ubicuitaria de este

patógeno y la resistencia que ofrece a condiciones adversas han sido objeto de intenso estudio, como queda reflejado en la literatura científica (Chen *et al.*, 2018).

La temperatura de crecimiento óptima del género *Cronobacter* es de 37-43 °C en aerobiosis. Sin embargo, este género es uno de los más termotolerantes de la familia Enterobacteriaceae al presentar un amplio rango de temperaturas en las que puede crecer (6-47 °C). Otra característica de este coliforme es la osmotolerancia, es decir, la resistencia a actividades de agua ( $a_w$ ) muy bajas con un rango de 0,30-0,83. Además, varios estudios han demostrado la resistencia del género *Cronobacter* a pH ácidos cercanos a 3. Todas estas condiciones favorecen que un microorganismo ubicuitario como es el caso de *Cronobacter sakazakii* se encuentre presente en una amplia variedad de alimentos, aun habiendo sido sometidos a diferentes tecnologías de procesado (Gurtler, Kornacki y Beuchat, 2005; Healy *et al.*, 2010).

La dosis infecciosa del género *Cronobacter* es desconocida. Sin embargo, se estima que podría ser de 10 a 100 microorganismos, similar a la de *Escherichia coli* O157:H7. La sintomatología de la infección por *Cronobacter* spp. suele ser grave. Entre los síntomas más comunes destacan, la meningitis, septicemia, enterocolitis necrotizante, meningoencefalitis necrótica, e incluso la muerte con un rango de mortalidad del 20 al 50%. La enfermedad puede afectar a un amplio espectro de edades. No obstante, la población diana suelen ser niños menores de 12 meses de edad, de los cuales, existe un mayor riesgo en aquellos con menos de 2 meses de edad, prematuros, con bajo peso al nacer y/o inmunodeprimidos (ANSES, 2011; FSAI, 2011; Fei *et al.*, 2017).

A nivel mundial, los casos de infección por *Cronobacter sakazakii* se presentan en una media de menos de 5 casos por año. Esta cifra parece estar subestimada, ya que no todos los laboratorios clínicos llevan a cabo investigaciones para identificar el agente patógeno, ni todos los países reportan los casos de enfermedad. En los últimos años, el número de casos por infección de *C. sakazakii* ha aumentado, obligando a clasificarlo como patógeno emergente, como queda reflejado en la literatura científica (EFSA, 2004; Fiore, Casel y Aureli, 2008).

En la actualidad, *C. sakazakii* supone un problema para la medicina y la industria alimentaria, al ser capaz de resistir a antibióticos y formar biofilms en las superficies de los equipos. Los biofilms son conjuntos de microorganismos asociados en una matriz

viscosa formada por una sustancia polimérica extracelular (EPS, del término en inglés *extracellular polymeric substance*). Esta matriz favorece la resistencia de las bacterias a situaciones de estrés como la escasez de nutrientes y agua, y también a la presencia de biocidas y/o agentes antimicrobianos. En concreto, los biofilms de *Cronobacter sakazakii* son diferentes según la cepa y dependen del medio y la superficie en la que se encuentran. Por otro lado, el tratamiento con antibióticos de la infección por esta bacteria parece eficaz. Sin embargo, algunas cepas de este patógeno parecen estar ofreciendo resistencia a los antibióticos. Este fenómeno es el resultado de mecanismos fisiológicos que sufren las bacterias para modificar sus características genotípicas y fenotípicas y así, adaptarse a situaciones de estrés (Hartmann *et al.*, 2010; Al-Nabulsi *et al.*, 2011; Jung, Choi y Lee, 2013).

El género *Cronobacter* se ha aislado de diversas fuentes como el suelo, agua, vegetales y animales. La ubicuidad, resistencia y formación de biofilms favorecen que este patógeno se presente en un amplio rango de alimentos de origen vegetal o animal sometidos a distintos procesos tecnológicos. Además, los alimentos listos para el consumo (RTE, del término en inglés *ready-to-eat foods*) se han asociado con un riesgo potencial de infección por *Cronobacter* spp. en individuos inmunodeprimidos. No obstante, la mayoría de brotes de infección por *Cronobacter sakazakii* se ha asociado a las fórmulas infantiles en polvo (PIF, del término en inglés *powdered infant formula*) con una prevalencia de entre 9 y 35% (Craven *et al.*, 2010; Strydom *et al.*, 2012).

*Cronobacter sakazakii* es capaz de persistir durante dos años en alimentos deshidratados, como es el caso de las PIF. Las causas de contaminación con esta bacteria se han identificado con: a) la adición de ingredientes contaminados y/o la contaminación durante el procesamiento del producto; b) la reconstitución y manipulación del contenido de la fórmula para su uso. De esta manera, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece la ausencia en 10 g de *Enterobacter sakazakii* en preparados deshidratados para lactantes y en alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de 6 meses. La industria alimentaria para alcanzar este criterio de seguridad ha establecido una serie de pautas para reducir y/o eliminar la presencia de este patógeno. Algunas de ellas se centran en aplicar buenas prácticas de higiene y manufactura, controlar el ambiente de producción como el aire, superficies, utensilios, etc. y establecer criterios para la aceptación de las materias primas. Por otro lado, expertos de la FAO y OMS proponen recomendaciones para los



potenciales consumidores de las PIF como alimentar al niño con leche materna hasta los 6 meses de vida, o seguir estrictamente las instrucciones de manejo para la reconstitución de la leche en polvo (INFOSAN, 2005; FDA, 2012).

El mecanismo de infección de *Cronobacter sakazakii*, tras la ingesta oral, se basa en el daño tisular del epitelio para atravesar la barrera intestinal y así, llegar al sistema circulatorio. Esta bacteria requiere de las estructuras celulares para multiplicarse e invadir el intestino. Las proteínas de membranas externas de este patógeno como la OmpX y OmpA (Omp, del término en inglés *Outer membrane protein*) parecen desempeñar un papel importante en el mecanismo de infección celular basolateral. Además, se han descrito otros factores de virulencia como el sistema de adquisición de hierro, la utilización del ácido siálico (como nutriente), el sistema Efflux (resistencia a cationes de cobre y plata), los enzimas proteolíticos (deformación celular), los lipopolisacáridos (rompen las uniones estrechas), las proteasas de membrana externa (resistencia frente a sustancias bactericidas), la enterotoxina (toxina termoestable) y la hemolisina tipo III (actividad hemolítica) (Kim *et al.* 2010; Singh, Goel y Raghav *et al.*, 2017).

La respuesta intestinal frente a las bacterias es compleja y desencadena la proliferación de células del epitelio, la producción de inmunoglobulinas como las IgA, el mantenimiento de uniones estrechas y la expresión de péptidos antimicrobianos. Sin embargo, en algunos casos más graves, la respuesta puede ser pro-inflamatoria capaz de desencadenar cáncer de colon si se desregula y/o generar disbiosis intestinal, es decir, el mecanismo de interrupción de la simbiosis entre las bacterias comensales y el intestino, que cambia la composición del medio y el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de las bacterias intestinales. La regulación de la respuesta intestinal la llevan a cabo los receptores tipo toll (TLR, del término en inglés *Toll-Like Receptors*). En humanos, se conocen 11 tipos de TLR que actúan con patrones moleculares asociados a bacterias patógenas (PAMP, del término en inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Los TLR al detectar los PAMP se dimerizan y sufren un cambio conformacional que favorece el reclutamiento de moléculas de señalización, desencadenando la respuesta intestinal (Abreu, 2010; Zeng, Inohara y Nuñez, 2017).

Los TLR 2 y 4 se localizan en la superficie celular y se expresan a niveles bajos por las células del epitelio intestinal del colon humano sano, según se indica en la literatura.

Además, la deficiencia de estos TLRs parece aumentar la mortalidad en animales. En concreto, el TLR 4 se expresa en elevadas cantidades en pacientes con enfermedad de Crohn y en niños prematuros con enterocolitis necrotizante. No obstante, la continua expresión del receptor TLR 4 se encuentra asociada con el cáncer de colon y con la protección de las células tumorales (Abreu, 2010).

Las glicoproteínas de la leche mencionadas anteriormente parecen estar implicadas en la regulación de la señalización del TLR 4 y evitar o reducir las respuestas pro-inflamatorias. Entre ellas, la lactoferrina añadida *in vitro* parece presentar un efecto simultáneo en el que aumenta ligeramente la señal pro-inflamatoria, aunque el efecto es mayor al inhibir la unión de los TLR 4 con los PAMPs presentes en los patógenos y al reducir la expresión de endotoxinas. Sin embargo, la actividad de las glicoproteínas en ensayos *in vivo* es completamente anti-inflamatoria relacionándose con el tratamiento de algunas enfermedades como la enterocolitis necrotizante (He, Lawlor y Newburg, 2016).

### 3. Justificación y objetivos

Este trabajo forma parte del proyecto titulado “Efecto de los tratamientos tecnológicos en la actividad de proteínas y fracciones lácteas en la funcionalidad intestinal: potencial para su aplicación en alimentos funcionales” de la convocatoria Retos-Sociedad 2017 del Ministerio de Economía y Competitividad (Referencia AGL2017-82987-R). El grupo de investigación sobre el efecto del procesado tecnológico de los alimentos en las patologías digestivas y alérgicas (ALIPAT), de carácter multidisciplinar y reconocido por el Gobierno de Aragón, es el encargado de llevar a cabo este proyecto. El objetivo principal de este proyecto es estudiar la actividad de proteínas y fracciones lácteas como inhibidores de la adhesión y proliferación de bacterias y virus a las células epiteliales intestinales, y el efecto de los tratamientos térmicos y no térmicos sobre ellas, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados esperados en este proyecto tienen una aplicación práctica potencial, en relación con la producción de nuevos alimentos funcionales y con la revalorización de los principales subproductos de la industria láctea, correspondiendo uno de sus objetivos parciales con el objetivo principal de este trabajo.

El **objetivo principal** de este Trabajo de Fin de Máster ha sido el aislamiento de fracciones y proteínas lácteas con actividad defensiva y la evaluación de su actividad antimicrobiana frente al patógeno *Cronobacter sakazakii*, utilizando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Aislamiento y caracterización de fracciones y proteínas lácteas.
- Determinación de la capacidad antimicrobiana de las proteínas lácteas frente a *C. sakazakii*.
- Determinación de la capacidad de inhibición de las proteínas lácteas de la adhesión de *C. sakazakii* a la línea celular Caco-2.
- Evaluación de los aspectos de viabilidad y estrés oxidativo de las células tras los ensayos de inhibición de la adhesión.
- Evaluación de la expresión de los receptores tipo Toll 2 y 4 en los ensayos de inhibición de la adhesión.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Aislamiento de las fracciones y proteínas lácteas

#### 4.1.1 Aislamiento y caracterización de las fracciones lácteas

El proceso de aislamiento de las fracciones lácteas se puede observar en la figura 6. La leche cruda de vaca suministrada por la empresa Villacorona (El Burgo de Ebro, Aragón, España) en una cantidad de 25 litros fue sometida a un desnatado previo en una centrífuga desnatadora modelo ARR-DES 125 (Suministros Químicos Arroyo, Santander, España). La fracción desnatada obtenida fue incubada con 3 mL de cuajo natural y 4 mL de cloruro cálcico (Laboratorios Arroyo, Santander, España) durante 45 min a 35 °C en cuba quesera. Tras la coagulación de las caseínas, el corte de la cuajada se realizó con lira vertical.

El lactosuero obtenido fue filtrado mediante gasa quesera y se centrifugó a 2000 x g durante 15 min a 4 °C. Para obtener una fracción concentrada, el lactosuero se neutralizó con NaOH 1 M hasta un pH de 6 y fue sometido a ultrafiltración hasta concentrarse dos veces su volumen utilizando un equipo de fibra hueca modelo DC 2 (Amicon, Danvers, MA, EE.UU.) con un punto de corte de 3 kDa. El lactosuero obtenido se congeló a -20 °C.

La nata obtenida en el desnatado contenía un 60% de grasa que fue determinada mediante el método Gerber con un butirómetro. Una parte de la nata fue sometida a tres lavados con el tampón fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, cloruro potásico 3 mM, cloruro de sodio 0,14 mM, pH 7,4 (PBS), con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM en la proporción de nata y tampón 2:1 (v/v) mediante centrifugación a 2000 x g durante 20 min a 4 °C. Las fracciones de nata lavada y no lavada se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche para favorecer la cristalización de los glóbulos grasos. Tras este periodo, la nata se sometió a agitación mecánica con una batidora Philips Cucina (Philips, Ámsterdam, Holanda) hasta la formación de los granos de mantequilla por aglomeración de los glóbulos grasos. El suero de mantequilla o mazada (buttermilk) liberado, en el proceso de inversión de fases, de los granos de mantequilla se filtró con gasas queseras para eliminar los restos de grasa aglomerada.

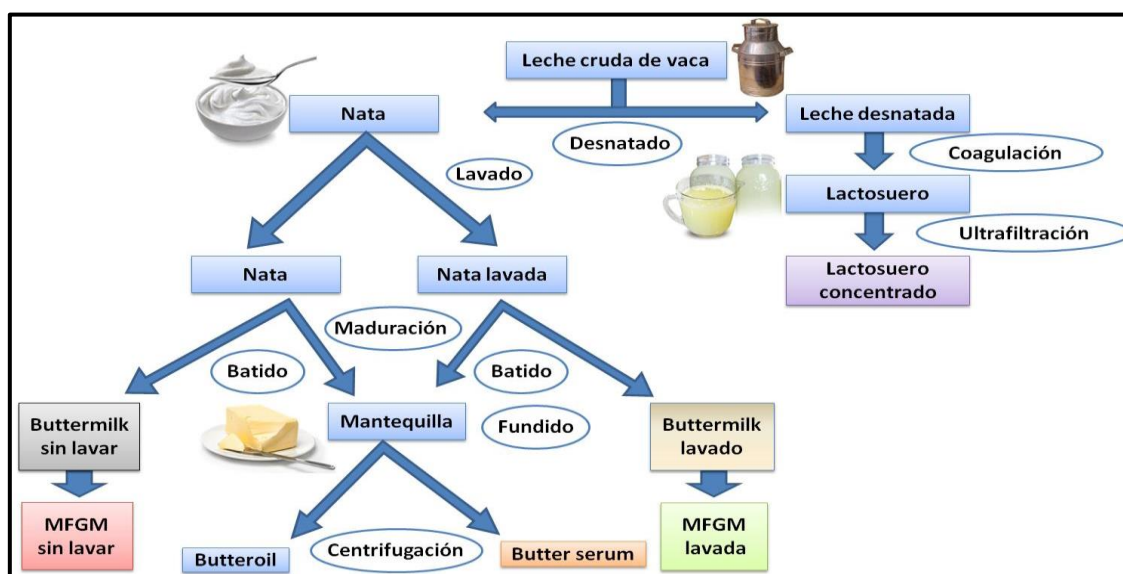
Para obtener la membrana del glóbulo graso (MFGM, del término en inglés *milk fat globule membrane*) a partir del buttermilk, los dos tipos de buttermilk obtenidos se

acidificaron hasta un pH de 4,65 con HCl 2 M y se centrifugaron a 12000 x g durante 75 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en el tampón de lavado (PBS/EDTA). Las fracciones de MFGM obtenidas de los buttermilk provenientes de nata lavada y no lavada fueron congeladas a -20 °C.

Los granos de mantequilla obtenidos en el batido de la nata lavada y no lavada se mezclaron y se fundieron a 50 °C durante 10 min. Después, se centrifugaron a 2000 x g a 4 °C durante 10 min. La fracción acuosa resultante es la mazada retenida en la mantequilla, que denominaremos butter serum. Esta fracción se recogió atravesando la fracción grasa superior (aceite de mantequilla o butteroil) con una pipeta Pasteur y se guardó en congelación a -20 °C.

La mazada no lavada se mezcló con el butter serum en una proporción 7:1 (v/v) y se acidificó hasta alcanzar un pH de 4,8 con HCl 1 M. La mezcla se agitó durante 30 min a 4 °C y se centrifugó a 40000 x g durante 30 min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió con agua Milli-Q, se ajustó el pH a 6,8 con NaOH 0,1 M y se congeló a -20 °C. Así, se obtuvo una fracción enriquecida en las proteínas de membrana del glóbulo graso.

La concentración de proteína de cada fracción se determinó mediante la técnica del ácido bicinonínico (BCA) utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) y las fracciones obtenidas se caracterizaron por electroforesis mediante el equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).



**Figura 6.** Esquema del aislamiento de las fracciones de buttermilk, butter serum y lactosuero obtenidas a partir de leche cruda.

#### 4.1.2 Aislamiento de mucinas

El procedimiento de aislamiento de las mucinas se fundamenta en una degradación enzimática de fracciones lácteas enriquecidas en MFGM. Las fracciones de mazada lavada y no lavada, butter serum y lactosuero concentrado fueron seleccionadas para el aislamiento de estas proteínas.

Las muestras se llevaron a una concentración de proteína de 1 mg/mL con ácido fórmico al 5% hasta alcanzar un pH final por debajo de 2. La pepsina procedente de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) fue añadida en la proporción 0,4:100 (enzima: proteína, p/p) y la mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C en agitación suave. Tras la incubación, la pepsina fue inactivada ajustando la solución a un pH de 7 con NaOH 4 M. Los péptidos obtenidos en la hidrólisis se eliminaron mediante una célula de ultrafiltración (Amicon INC., Beverly, MA, EE.UU.) con un punto de corte de 30 kDa.

La fracción enriquecida en mucina obtenida se sometió a purificación por cromatografía en gel siguiendo el protocolo de Kodama y Kimura (2001). Para ello, se aplicaron 1,5 mL de la fracción a una columna de Sepharose CL-2B (90 x 1 cm), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, con NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM y 0,02% de NaN<sub>3</sub> (azida sódica) (VWR, Leuven, Bélgica). Las fracciones recogidas fueron de 3 mL a un flujo de 0,5 mL/min, determinándose su absorbancia a 280 nm. Las fracciones se caracterizaron por electroforesis, como se describe más adelante.

#### 4.1.3 Aislamiento de una fracción enriquecida en lactadherina

El aislamiento de lactadherina se realizó siguiendo el procedimiento desarrollado por Kim *et al.* (1992) con algunas modificaciones.

La fracción enriquecida en MFGM, obtenida como se ha descrito anteriormente, en un volumen de 10 mL, se delipidó añadiendo una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v) en una relación 9:1 (v/v) incubándose durante una noche en agitación suave a 4 °C. Para romper la emulsión, se añadió 1 volumen de agua Milli-Q y se centrifugó a 3400 x g durante 15 min a 10 °C. La fracción intermedia entre el metanol y el cloroformo se recuperó y se le añadió un volumen de agua destilada. Los residuos de solventes orgánicos que quedaron en la fracción recuperada se eliminaron con un rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Alemania). La fracción enriquecida en MFGM delipidada se resuspendió en tampón NaCl 0,02 M. Después, se centrifugó a 25000 x g

durante 1 h a 4 °C y el precipitado se resuspendió en el tampón Tris-HCl 0,1 M, KCl 1 M, pH 8,2, con urea 5 M y benzamidina 0,2 mM como inhibidor de proteasas, agitándose durante 12 h a 4 °C. Tras la agitación, la solución se centrifugó a 40000 x g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se concentró en un dispositivo de ultrafiltración (Amicon INC., Beverly, MA, EE.UU.) de punto de corte de 10 kDa. Las fracciones obtenidas se caracterizaron por electroforesis.

La fracción concentrada se aplicó a una columna de Sephacryl S-200 High Resolution (80 x 1 cm) en un volumen de 1,2 mL. La columna fue previamente equilibrada con el tampón Tris-HCl anteriormente utilizado. El flujo se mantuvo a 0,2 mL/min y las fracciones recogidas fueron de 1,6 mL. Estas fracciones se analizaron por electroforesis.

## **4.2 Técnicas electroforéticas**

### 4.2.1 Preparación de geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se prepararon en dos fases de diferente composición, un gel de separación (“resolving gel”) y otro de concentración (“stacking gel”) de 10 y 7%, respectivamente. La preparación del resolving gel consistió en mezclar 3,3 mL de una solución de acrilamida-bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, EE.UU.) al 30%; 2,5 mL de un tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 100 µL de SDS al 10% (p/v) y 4,1 mL de agua Milli-Q. Antes de cargar el gel entre los vidrios, se añadieron 5 µL de TEMED (iniciador de la polimerización) y 50 µL de persulfato de amonio al 10% en agua Milli-Q (catalizador de la reacción). Se añadieron 4,5 mL de la mezcla, tras lo cual se añadieron 300 µL de 2-metil-2 butanol para cubrir el gel y evitar su deshidratación. Tras dejar solidificar el gel durante 1 h, se retiró el alcohol, se lavó la superficie del gel tres veces con agua Milli-Q y se secó con papel Whatman 3MM. Por último, se preparó el stacking gel mezclando 1,15 mL de la solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%; 1,25 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 50 µL de SDS al 10% (p/v) y 2,55 mL de agua Milli-Q y se siguió el mismo procedimiento anteriormente mencionado.

### 4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y técnicas de tinción

El procedimiento de las electroforesis que se llevaron a cabo en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se fundamenta en el protocolo descrito por Laemmli (1970). Las muestras se diluyeron 1:2 (v/v) en un tampón compuesto por Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, que contenía 20% de glicerol, 4% de SDS, 0,02% de azul de bromofenol y 10% de 2-

mercaptoetanol y se calentaron en un baño a 100 °C durante 5 min. Después, las muestras se cargaron en los pocillos del gel (de 4-20% y de 10% de poliacrilamida) y se aplicó un voltaje constante de 180 V utilizando un equipo Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Tras la electroforesis, la tinción del gel se llevó a cabo con dos técnicas diferentes, que se describen a continuación, dependiendo del tipo y concentración de las proteínas.

### **Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)**

La tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS, del inglés *periodic acid Schiff*) se ha utilizado específicamente para la tinción de glicoproteínas. Primero, el gel se transfirió a la solución de fijación constituida por ácido acético, metanol y agua destilada (10:35:55, v/v/v) y se mantuvo durante toda una noche a temperatura ambiente y en agitación suave. La solución se sustituyó por una solución de peryodato preparada con 0,35 g de ácido peryódico en 50 mL de ácido acético glacial al 5% (v/v) y se incubó en agitación durante 1 h. Tras la incubación, se retiró la solución y se enjuagó el gel rápidamente dos veces con agua Milli-Q. A continuación, se añadieron 50 mL de una solución de meta-bisulfito preparada con 0,2 g de meta-bisulfito sódico en 100 mL de ácido acético glacial al 5% (v/v) (en agua Milli-Q) hasta cambiar el color del gel a amarillo. Tras retirar la solución, se añadieron otros 50 mL de meta-bisulfito para decolorar el gel en agitación durante 10 min. El gel decolorado se mantuvo en agitación durante 2 h a temperatura ambiente en el reactivo de Schiff. Para decolorar y continuar la tinción con azul de Coomassie, se añadieron 50 mL de la solución de fijación en dos veces con incubaciones de 7 min en agitación. Por último, el gel se mantuvo durante 7 min en una solución de decoloración preparada con ácido acético y agua destilada (1:9, v/v).

Para la preparación del reactivo de Schiff, se disolvieron 4 g de pararosanilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en 800 mL de agua Milli-Q a 95 °C y la solución se dejó agitando durante 10 min en un baño a 100 °C. Después, se enfrió hasta 50 °C y se le añadieron 80 mL de HCl 1 M, agitando la solución hasta que alcanzó una temperatura de 25 °C. Seguidamente, se añadieron 6,8 g de disulfito de sodio a la solución y se esperó hasta la solubilización completa del reactivo. Tras mantener la mezcla a 4 °C durante toda la noche, se añadieron 20 g de carbón activo y se agitó durante 30 min. Por último, se filtró mediante un embudo de vidrio sinterizado y se guardó a 4 °C hasta su uso.



## **Tinción con azul de Coomassie**

Tras finalizar la tinción PAS y registrar los resultados mediante escaneado del gel, los geles se tiñeron con el colorante azul de Coomassie, compuesto por 0,65 g de Azul de Coomassie Blue R, 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético, 100 mL de glicerol y 500 mL de agua destilada. El gel se cubrió totalmente con el colorante y se mantuvo en agitación durante 1 h. Después, se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante compuesto por 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. El gel permaneció en la mezcla de decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas del gel sin bandas de proteína.

## **4.3 Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Para ello, se prepararon estándares de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones entre 2 y 125 mg/mL. Después, se añadieron 20 µL de los estándares y de las muestras, por duplicado, en una placa de 96 pocillos. Se preparó el reactivo del BCA justo antes de usarlo y se añadió en una cantidad de 200 µL por pocillo. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). La concentración de proteína en las muestras se determinó por interpolación en la recta de calibrado obtenida con los valores correspondiente a los estándares de BSA.

## **4.4 Cultivo celular**

### **4.4.1 Siembra y mantenimiento del cultivo celular**

La línea celular utilizada para los ensayos de actividad antibacteriana, cedida por el Área de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, fue el clon TC-7 de la línea Caco-2, que es una línea celular epitelial de carcinoma de colon humano. Las células se cultivaron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> con sistemas de venteo (TPP, Trasadingen, Suiza) y se mantuvo en el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA) al 1% (v/v), suero fetal bovino (FCS) al 20% (v/v), L-glutamina 2 mM, 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (100 Unidades/mL y 100 µg/mL) y 1% (v/v) de anfotericina B 0,25 µg/mL. Los frascos de cultivo se mantuvieron en un incubador termostatzado Heraeus (Heraeus, Hanau, Alemania) a 37 °C en atmósfera saturada de humedad con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el mantenimiento de la línea celular o subcultivo, se eliminó el medio de los frascos de cultivo y la monocapa celular se lavó con 5 mL de tampón NaCl 140 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4 (PBS). Seguidamente, se adicionó una solución de tripsina al 0,025% y EDTA al 0,02% en un volumen de 5 mL para lavar la monocapa, el exceso se retiró hasta dejar 0,1 mL y se incubó durante 5-10 min en el incubador a 37 °C con el frasco cerrado. Tras la incubación, el frasco se golpeó para despegar las células, se añadió medio con FCS (la tripsina queda inhibida con los inhibidores de proteasas del suero fetal) y se resuspendió para disgregar los acúmulos celulares. A continuación, se tomó de la suspensión celular un volumen de 50  $\mu\text{L}$  para proceder al recuento de las células en cámara de Thoma en un microscopio invertido TMS (Nikon, Tokio, Japón). De esta manera, el recuento celular posibilita el cálculo del volumen de suspensión necesario para sembrar a la densidad adecuada en los frascos de cultivo, siendo de  $2,5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  en la línea Caco-2.

La siembra, la preparación del medio de cultivo, el mantenimiento del cultivo celular y la preparación de las muestras para los ensayos se realizaron en ambiente estéril en una campana de flujo laminar vertical Micro-V (Telstar S.A., Terrassa, España).

#### 4.4.2 Congelación y descongelación de células

Las células Caco-2 se cultivaron en frascos de 75  $\text{cm}^2$  para aumentar el número de células, y se tripsinizaron en el estado de confluencia. Las células obtenidas se centrifugaron a 100 x g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en el medio de congelación constituido por 90% de DMEM con FCS al 20% y dimetilsulfóxido al 10% (DMSO). La suspensión se ajustó a  $12 \times 10^6$  células/mL y se distribuyó en alícuotas de 1 mL en viales de congelación. Los crioviales se envolvieron con lana de vidrio para evitar el descenso brusco de la temperatura y se colocaron dentro de un recipiente de 100 mL que se llevó a un congelador de -70 °C durante una noche. Al día siguiente, los crioviales se introdujeron en un contenedor de nitrógeno líquido (Air Liquide, Tarragona, España) con capacidad de 11 L para su almacenamiento y conservación.

La descongelación se realizó introduciendo los viales de congelación en un vaso con agua a 37 °C. Tras la descongelación, la suspensión celular se trasladó a un tubo de fondo cónico estéril con 20 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 100 x g durante 10 min, con el objetivo de eliminar el medio de congelación. Las células se resuspendieron en medio completo y se transfirieron a frascos de 25  $\text{cm}^2$ .

#### 4.4.3 Cultivo de las células Caco-2 en placas de 96, 24 y 6 pocillos

Las células cultivadas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> se tripsinizaron en el estado de confluencia como se ha descrito anteriormente. La suspensión celular se mezcló con DMEM completo, y se añadieron volúmenes de 200 µL, 2 mL y 4 mL por pocillo en placas de cultivo celular de 96, 24 y 6 pocillos, respectivamente. De esta manera, la densidad por pocillo fue de aproximadamente  $1,4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo se eliminó cada tres días mediante vacío con una pipeta Pasteur de vidrio estéril. Las células se utilizaron a los 7-10 días de cultivo para realizar los ensayos que se describen posteriormente.

#### **4.5 Cultivo de *Cronobacter sakazakii***

La cepa bacteriana de *C. sakazakii* CECT 858 utilizada procede de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) y es equivalente a la cepa ATCC 29544. Para realizar los ensayos, se partió de un stock de referencia en el que se encontraba el microorganismo fijado a anillos porosos almacenados en crioviales a -70 °C.

El cultivo de *C. sakazakii* se llevó a cabo de la siguiente manera. Primero, se transfirió un anillo poroso a un tubo con 10 mL de caldo tripticasa soja (TSB) (Merck, Darmstad, Alemania) suplementado con extracto de levadura (YE) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) al 0,6% (p/v) y se incubó durante 24 h a 37 °C. Al día siguiente, se procedió a su aislamiento mediante siembra por agotamiento en una placa de agar tripticasa soja (TSA) (Merck, Darmstad, Alemania) suplementado con YE al 0,6% y se incubó a 37 °C durante 24 h. La placa de TSA con colonias aisladas se guardó en refrigeración para realizar ensayos posteriores.

#### **4.6 Preparación de lactoferrina bovina nativa**

La proteína ensayada fue lactoferrina bovina nativa procedente de Tatua Nutritional (Morrinsville, Nueva Zelanda). Para los ensayos realizados, se partió de una solución madre de esta proteína en agua destilada de 20 a 40 mg/mL dependiendo del ensayo y se esterilizó con un filtro Millex-MP (Millipore, Cork, Ireland) de baja adsorción de proteínas de 0,22 µm. La concentración de proteína tras la filtración se determinó tomando 10 µL de la solución de lactoferrina estéril que se diluyeron 1/100 en agua

destilada. Después, se midió la absorbancia de la dilución a 280 nm y se calculó la concentración considerando un coeficiente de extinción ( $E^{1\%}_{280}$ ) de 1,27 mL/cm/g.

La lactoferrina fue caracterizada por electroforesis presentando un alto grado de pureza. Además, se determinó la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en esta proteína mediante el kit colorimétrico ToxinSensor™ Chromogenic LAL (GenScript, New York, EE.UU.) para la detección de endotoxinas bacterinas.

#### **4.7 Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii***

Se incubó una colonia de *Cronobacter* en 10 mL de TSB con YE al 0,6% durante 18-20 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en tubos con 9 mL de agua de peptona bacteriológica al 1% hasta conseguir una concentración final de 4-5 u.log, como se determinó posteriormente mediante recuento en placa de TSA suplementado con YE al 0,6%. La suspensión bacteriana obtenida se añadió en un volumen de 100 µL/pocillo en una placa de 96 pocillos estéril, mezclándola con 100 µL de diferentes concentraciones de lactoferrina bovina nativa (0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL), mucinas (0,1 mg/mL) y lactadherina (1 mg/mL). Se incluyeron como controles, pocillos solo con la suspensión bacteriana sin las proteínas, y la placa se incubó a 37 °C. Las muestras y el control se incluyeron por duplicado.

La evaluación de la actividad antibacteriana de las proteínas se llevó a cabo tomando alícuotas de 100 µL de los pocillos a las 4 y 24 h de incubación para la lactoferrina y a las 4 h para las mucinas y la lactadherina que fueron diluidas en PBS estéril y se sembraron en superficie en placas de TSA suplementadas con YE al 0,6%. Las placas se incubaron a 37 °C y el recuento se realizó a las 24 h.

#### **4.8 Ensayos de inhibición de la adhesión bacteriana**

Los ensayos de inhibición de la adhesión se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos con células Caco-2 cultivadas durante 7-10 días. A los pocillos se les eliminó el medio DMEM completo, se lavaron con 2 mL/pocillo de PBS estéril, se les añadieron 2 mL/pocillo de DMEM con 1% de glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales, sin suero fetal bovino ni antibióticos, que denominamos medio básico, y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Después, cada pocillo se lavó con 2 mL de PBS estéril y se añadieron 150 µL de las soluciones de lactoferrina a diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 5, 10 mg/mL) por duplicado, y diluidas en el medio básico. Se incluyeron dos

pocillos control, sin las proteínas y con el medio básico, y la placa se incubó 1 h a 37 °C. Tras la incubación, se añadieron 50 µL/pocillo de la suspensión bacteriana, con unas concentraciones de *Cronobacter sakazakii* de 4-5 u.log. y de 8-9 u.log., que se determinaron por recuento en placa. La placa se incubó durante 4 h a 37 °C. A continuación, los pocillos se lavaron con 2 mL/pocillo de PBS estéril y se les añadió 200 µL/pocillo de 150 µg/mL de gentamicina, incubándolos durante 2 h a 37 °C para eliminar las bacterias que se han quedado en el exterior de las células y no han llegado a invadirlas, ya que este antibiótico no es internalizado en las células. Los pocillos se lavaron con 2 mL/pocillo de PBS estéril y se les añadieron 200 µL/pocillo de 1% de Tritón-X para levantar y permeabilizar las células. Por último, la suspensión obtenida de cada pocillo se trasladó a placas de TSA realizando previamente las correspondientes diluciones en tubos de 10 mL con agua de peptona bacteriológica al 1%. El inóculo de 50 µL se extendió en superficie con asa de Digrafsky y las placas se incubaron durante 20-24 h a 37 °C para llevar a cabo el recuento de colonias de la bacteria.

#### **4.9 Determinación de la citotoxicidad**

Las células Caco-2 cultivadas en placas de 96 pocillos a los 7-10 días de la siembra, y tras realizar la incubación con las diferentes muestras analizadas en este estudio, se evaluaron mediante un ensayo de citotoxicidad con el kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El fundamento del kit es producir una reacción colorimétrica utilizando el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolio) o MTS para determinar el número de células viables que se encuentran en proliferación. EL MTS es biorreducido por el NADPH o NADH de las enzimas deshidrogenasas de las células en un producto del formazán coloreado que es soluble en medio de cultivo celular. Estos ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra y en tres ensayos independientes en días diferentes. Para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad se procedió como se describe a continuación. En primer lugar, los pocillos se lavaron con 200 µL/ pocillo de PBS estéril, se les añadieron 200 µL/ pocillo de DMEM con 1% de glutamina y 1% de aminoácidos esenciales, incubando la placa 2 h a 37 °C con el fin de eliminar el suero fetal bovino y los antibióticos internalizados por las células. Tras la incubación, los pocillos se lavaron con 200 µL/ pocillo de PBS estéril, se añadieron por triplicado 50 µL/pocillo de distintas concentraciones de lactoferrina, 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL, y dos controles, uno sin proteína y otro con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM como citotóxico, y se incubaron

1 h a 37 °C. Después, se lavaron los pocillos con 200 µL/pocillo de PBS estéril y se les añadió a cada uno 200 µL de DMEM sin antibióticos ni suero feral bovino y 20 µL de MTS, incubándolos 2 h a 37 °C. La absorbancia se leyó a 492 nm en el equipo Multiskan MS. La citotoxicidad se determinó también en los ensayos de inhibición de la adhesión de *Cronobacter sakazakii*. En estos ensayos se añadieron 16,67 µL/pocillo de una suspensión de *Cronobacter sakazakii* de 4-5 u.log. (determinada por recuento en placa) tras la incubación con la lactoferrina. La placa se incubó durante 4 h a 37 °C. Después, se añadieron 60 µL/pocillo de 150 µg/mL de gentamicina, dejándola actuar durante 2 h a 37 °C. La gentamicina se eliminó, se lavaron los pocillos con 200 µL de PBS estéril y se añadieron 200 µL de DMEM sin antibióticos ni suero feral bovino y 20 µL de MTS, midiendo la absorbancia a 492 nm tras las 2 h de incubación a 37 °C.

#### **4.10 Determinación del estrés oxidativo**

El estrés oxidativo experimentado por las células Caco-2 en los ensayos de inhibición de la adhesión de *Cronobacter sakazakii* por lactoferrina bovina nativa se evaluó en proteínas y lípidos. Para realizar estos análisis las células se cultivaron en placas de 6 pocillos durante 7-10 días y se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente en los ensayos de inhibición bacteriana hasta la incubación de las 4 h con la bacteria y la proteína, realizándose por duplicado para cada muestra y en tres ensayos independientes en días diferentes. Se incluyeron dos pocillos control, uno sin proteína ni bacteria y otro con bacteria y sin proteína, y para las muestras de lactoferrina se eligieron las concentraciones de 0,5 y 10 mg/mL. Este procedimiento se puede dividir en cuatro etapas:

##### *Preparación de homogenados celulares*

A los pocillos se les retiró el medio y se lavaron 2 veces con 4 mL de PBS, tras lo cual las placas se mantuvieron en hielo picado para evitar degradaciones y se añadieron 200 µL/pocillo de tampón Tris-manitol pH 7,1 sobre la monocapa celular. Este tampón está compuesto por Tris 200 mM de Sigma, manitol 0,5 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 2% de azida sódica, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y 25 mg/mL de benzamidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). A continuación, se raspó la monocapa celular en toda su superficie con un cepillo raspador, sumergiendo el cepillo en el tampón varias veces y volviendo a

arrastrar las células que hubieran quedado adheridas. El raspado se recogió y se llevó a un homogeneizador o Potter cónico de cristal. A cada pocillo se le adicionaron 133,33  $\mu$ L de tampón Tris-manitol y se repitió el proceso.

Después, la varilla del Potter cónico se deslizó 40 veces sobre el raspado obtenido. El contenido de cada pocillo se vertió en un vial eppendorf y se mantuvo en hielo. Al Potter se le adicionaron 66,67  $\mu$ L de tampón Tris-manitol y se realizaron 10 subidas y bajadas de varilla. El contenido se vertió en el eppendorf en hielo y se introdujo en un sonicador modelo Bandelin Sonopuls (Bandelin electronics, Berlín, Alemania). Después, las muestras sonicadas se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min a 4 °C para eliminar el contenido nuclear. El sobrenadante recogido corresponde al homogenado celular sobre el que se realizaron las determinaciones de proteína, carbonilos y oxidación lipídica.

#### *Determinación del estrés oxidativo en lípidos: Cuantificación de MDA + 4-HDA*

Primero, se estableció una recta patrón con los estándares por duplicado en viales eppendorf de 2 mL. Los volúmenes de los reactivos se añadieron según la tabla 1, en el mismo orden que tienen las columnas. El compuesto 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), un análogo del malonaldehído (MDA), se encontraba diluido 1:100 (v/v) en Tris 50 mM pH 7,4 (S1 diluido). Por otro lado, el reactivo R1 se obtuvo de diluir 1-metil-2-fenilindol (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) en acetonitrilo (Panreac, Barcelona, España). Para el reactivo R1/metanol, se diluyó el compuesto R1 en metanol, siguiendo siempre una proporción 3:1 (v/v). El reactivo R2 consistía en ácido metanilsulfónico puro (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.).

S1 diluido ( $\mu$ L)	Tris 50mM ( $\mu$ L)	R1/metanol ( $\mu$ L)	R2 ( $\mu$ L)
0	60	195	45
0,4	59,6	195	45
1	59	195	45
4	56	195	45
6	54	195	45
10	50	195	45
14	46	195	45

**Tabla 1.** Volúmenes utilizados para realizar la recta patrón en el análisis de estrés oxidativo de lípidos con los reactivos en el orden que se debe realizar la adición.

Paralelamente, se añadieron 66,67  $\mu$ L del homogenado de las muestras y se les adicionaron 216,67  $\mu$ L de R1/metanol, agitando la mezcla con vórtex. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ L de R2 a las muestras y se homogeneizaron de nuevo con vórtex.

La recta patrón y las muestras se incubaron a 45 °C durante 40 min en baño termostático, se centrifugaron a 3000 x g durante 10 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante descartando el precipitado y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente. Tras este periodo, la recta patrón y las muestras se pasaron a una placa de microensayo de 96 pocillos y se midió su absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro de modelo Spectrostar nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania). La concentración de las muestras se calculó interpolando la absorbancia en la recta patrón.

#### *Determinación del contenido en proteínas: método Bradford*

Para la determinación del contenido en proteína del homogenado celular se realizó, en primer lugar, una recta patrón con los estándares por duplicado utilizando los volúmenes que aparecen en la tabla 2 de una solución de 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) tampón Tris-manitol pH 7,1 y reactivo Bradford compuesto por 5 mg de Azul de Coomassie G-250, 2,5 mL de 96% de etanol y 5 mL de ácido ortofosfórico. Del homogenado celular de las muestras, se tomaron 5  $\mu$ L por duplicado y se le adicionaron 15  $\mu$ L del tampón Tris-manitol pH 7,1 y 1 mL de reactivo de Bradford. La mezcla se homogeneizó mediante vórtex y se dejó reposar durante 5 min. La absorbancia se midió a 595 nm en el equipo Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). La concentración de proteína de las muestras se determinó interpolando los valores de la absorbancia en la recta patrón.

BSA ( $\mu$ L)	Tris-manitol ( $\mu$ L)	Bradford (mL)
0	20	1
2	18	1
5	15	1
10	10	1
15	5	1

**Tabla 2.** Recta patrón para determinar la concentración de proteína en los homogenados celulares. Los reactivos se han incluido en la tabla en orden de adición a las muestras.



#### *Determinación del estrés oxidativo en proteínas: Cuantificación de carbonilos*

Para determinar el contenido en carbonilos, se tomó un volumen de 25 µL del homogenado de las muestras por triplicado, se le añadieron 250 µL de Tris 50 mM, pH 7,4; 50 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) diluida en HCl 2 N y se incubaron a 37 °C durante 1 h en un baño termostático. Tras la incubación, se mantuvieron en hielo y se homogeneizaron con vórtex. A las muestras en hielo, se les adicionaron 81,25 µL de ácido tricloroacético al 50% frío (VWR, Leuven, Bélgica), se homogeneizaron con vórtex y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Después, se centrifugaron a 4000 x g a 4 °C durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 250 µL de etanol/etilacetato (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) 1:1 (v:v) y se resuspendió el precipitado. A partir de aquí, se realizaron 4 centrifugaciones sucesivas de 11000 x g durante 3 min a 4 °C cada una, eliminando el sobrenadante y lavando el precipitado con etanol/etilacetato. Tras la última centrifugación, el precipitado se disolvió en 175 µL de guanidina 6 M-HCl pH 2 (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 min. Luego, se centrifugaron durante 10 min a 12000 x g y a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a una placa de pocillos de 96, midiendo la absorbancia a 375 nm en el equipo Spectrostar nano. La concentración de carbonilos se calculó mediante la ley de Beer-Lambert:

$$\varepsilon = 22.00/\text{M} = 22.000/10^6 \text{ nmol/ml} \quad \text{Absorbancia} = l \cdot c \cdot \varepsilon$$
$$c = \text{Abs}/\varepsilon = \text{Abs}/22.000/10^6$$
$$c = \text{Abs} \times 45,45 \text{ nmol/mL}$$

#### **4.11 Expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 mediante RT-PCR**

La expresión de receptores se llevó a cabo en tres placas de 24 pocillos de células Caco-2 cultivadas de 7 a 10 días. Los pocillos seleccionados siguieron el mismo protocolo de los ensayos de inhibición de la adhesión con *C. sakazakii*. Así, se cultivaron dos pocillos con 0,5 y 10 mg/mL de LFb y dos pocillos control sin lactoferrina, uno infectado por la bacteria y otro sin infectar. Para determinar la expresión de los receptores tipo Toll 2 y 4 activados por las células cultivadas, se extrajo el RNA de las células, se obtuvo su DNA complementario (cDNA) mediante la acción de la retrotranscriptasa inversa (RT) y se amplificó el DNA obtenido con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (qPCR).

Además se añadieron cuatro controles, dos de ellos con 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina y los otros dos contenían 30 y 60 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

#### *Extracción del RNA*

El RNA se extrajo utilizando el mini kit RNeasy (QIAGEN, Venlo, Países Bajos). Las células de cada pocillo se lisaron al adicionar 350 µL/ pocillo del tampón RLT o de lisis con 10 µL de 2- mercaptoetanol y la mezcla obtenida se trasladó a un vial eppendorf. Las muestras se homogeneizaron con vórtex durante 1 min y se les adicionaron 350 µL de etanol al 70%. A continuación, se transfirieron los volúmenes de las muestras a columnas Rneasy y se centrifugaron durante 15s a 11000 x g, descartando el eluido. A cada columna, se le adicionaron 700 µL del tampón RW1, centrifugándolas 15s a 11000 x g y descartando el eluido. Luego, se repitió la centrifugación adicionando 500 µL del tampón RPE. A las muestras se les volvieron a adicionar 500 µL del tampón RPE, se centrifugaron durante 2 min a 11000 x g, se descartó el tubo de 2 mL acoplado a la columna por uno nuevo y se centrifugaron a 13000 x g durante 1 min para secar completamente la columna de etanol. Por último, se cambió el tubo de la columna de las muestras por un eppendorf de 1,5 mL, se adicionaron 40 µL de agua libre de RNAsas, se centrifugaron a 11000 x g durante 1 min y el ARN eluido se guardó a -80 °C hasta su uso. La cantidad de RNA obtenida por pocillo de una placa de 24 de células Caco-2 fue de alrededor de 100 ng/ µL.

#### *Retrotranscriptasa inversa*

Para obtener el cDNA del RNA mensajero (mRNA) de las células, se utilizó el kit RT-PCR MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis (Lucigen, Middleton, WI, EE. UU.). Primero, se realiza la fase de alineación de los primers Oligo(dT)2 con la hebra del RNA. Para ello, se adicionaron 2 µL de los primers Oligo(dT)2 y 10,5 µL del RNA de la muestra en los tubos de reacción y se llevaron a un termociclador de modelo Alpha Unit Block Assembly for DNA Engine Systems (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España), iniciando el ciclo de 65 °C durante 5 min y 1 min a 4 °C que desnaturaliza la hebra del RNA e hibrida los cebadores. Seguidamente, se adicionaron a cada muestra 2 µL de tampón 10 x, 2 µL de DTT 100 mM, 2 µL de un premix de dNTP, 0,5 µL de inhibidor de RNAsas Riboguard y 1 µL de la enzima MMLV transcriptasa inversa y se incubaron en el termociclador a 37 °C durante 60 min, a 85 °C durante 5 min y 1 min a

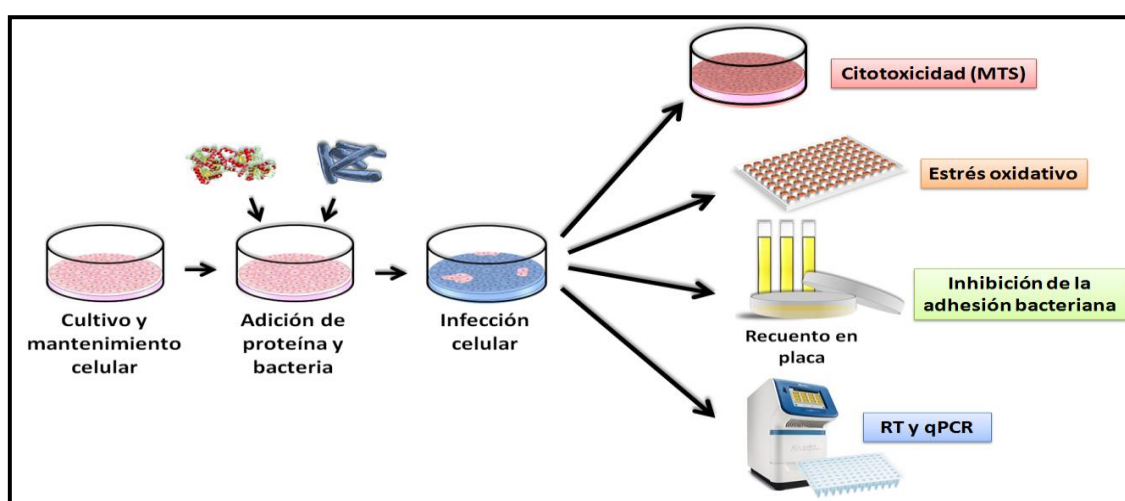
4 °C. La concentración de cDNA obtenida fue de entre 1-1,3 µg/µL, conservándose a -20 °C hasta su posterior uso.

### PCR a tiempo real

El procedimiento se llevó a cabo para determinar la expresión de 4 genes a estudiar: GADPH, HPRT1, TLR2 y TLR 4, utilizando las secuencias de los primers forward y reverse, incluidas en la tabla 3. Los dos primeros genes son genes control o housekeeping. Al principio, se preparó la mezcla de los primers y mastermix que consistió en 10 µL de Sybr green, 0,5 µL de primer forward, 0,5 µL de primer reverse y 7 µL de agua libre de RNAsas y se adicionó en un placa de 48 pocillos. Posteriormente, se añadieron 2 µL de cDNA diluido 1/5 en agua libre de RNAsas a cada pocillo de PCR y se introdujo la placa en el equipo Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) de qPCR (del término en inglés, *quantitative PCR*). Los resultados obtenidos de los ciclos umbrales (Ct) se analizaron estadísticamente restando los Ct de una muestra de los genes TLR2 y 4 con la media de los genes GADPH y HPRT1 y lo obtenido se restó del control negativo. Por último, el resultado se expresó como potencia de 2.

	TLR2	TLR4
Forward	5' GAAAGCTCCCAGCAGGAACATC 3'	5' TTGAGCAGGTCTAGGGTGATTGAAC 3'
Reverse	5' GAATGAAGTCCCGCTTATGAAGACA 3'	5' ATGCGGGACACACACACTTTCAAATA 3'
	GADPH	HPRT1
Forward	5' CATGACCACAGTCCATGCCATCACT 3'	5' CTGACCTGCTGGATTACA 3'
Reverse	5' TGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	5' GCGACCTTGACCATCTTT 3'

**Tabla 3.** Secuencias forward y reverse de los primers de los genes TLR2 y 4, GADPH y HPRT1 utilizados en la qPCR.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento empleado en el desarrollo de los ensayos con cultivos celulares.

#### **4.12 Análisis estadístico de los resultados**

El análisis estadístico de los resultados en este Trabajo Fin de Máster se ha realizado utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

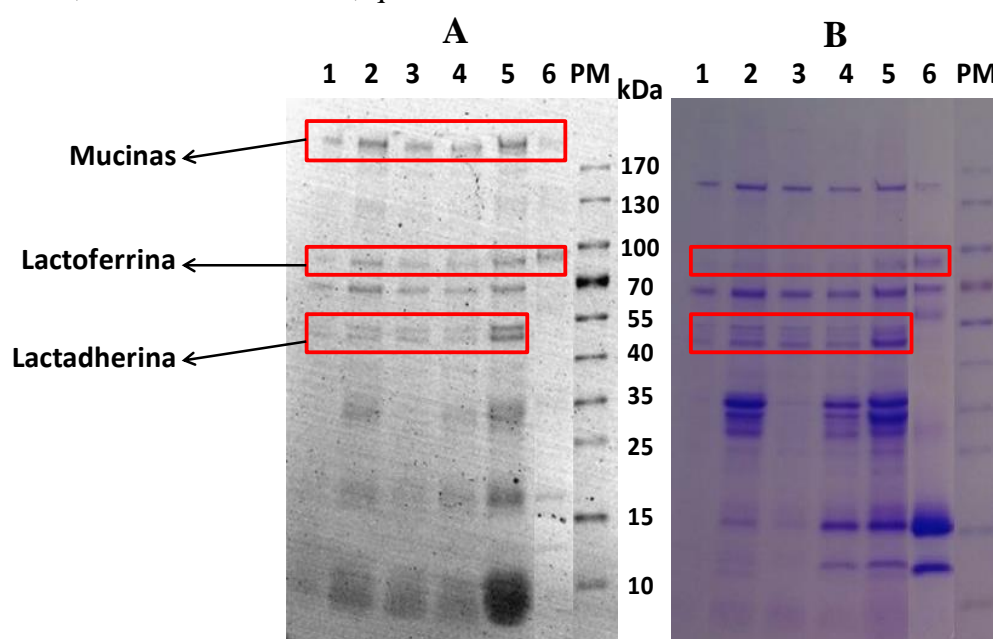
La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Kolmogorv-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene. Los datos que no seguían una distribución normal se sometieron al test de Man-Whitney, determinando que todos los datos obtenidos no se debían al azar. Para comprobar si las diferencias entre las medias eran significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA, del término en inglés *analysis of variance*) con una prueba posterior que permitiera determinar qué medias difieren entre sí. Por último, se utilizó la prueba post hoc de Tukey y se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor  $p \leq 0,05$ . Para indicar las diferencias significativas, se han utilizado asteriscos (\*) en las gráficas de los resultados.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Aislamiento de las fracciones y proteínas lácteas

#### 5.1.1 Aislamiento y caracterización de las fracciones lácteas

En la figura 8, se muestran las fracciones de buttermilk y MFGM procedentes de nata lavada y no lavada, butter serum y lactosuero 2 veces concentrado, obtenidas de leche cruda de vaca por los procedimientos anteriormente descritos. Las mucinas y lactadherina y la lactoferrina, proteínas de la MFGM y del lactosuero con pesos moleculares de 170-200, 45 y 80 kDa, respectivamente, aparecen en todas las fracciones aisladas, salvo la lactadherina, que no se encuentra en el lactosuero concentrado.



**Figura 8.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) del aislamiento de las fracciones lácteas teñidas con PAS (A) y con azul de Coomassie (B). PM: Marcador de pesos moleculares. MFGM lavada (1), MFGM no lavada (2), buttermilk lavado (3), buttermilk no lavado (4), butter serum (5) y lactosuero (6). Las bandas correspondientes a las mucinas, lactadherina y lactoferrina aparecen recuadradas en rojo.

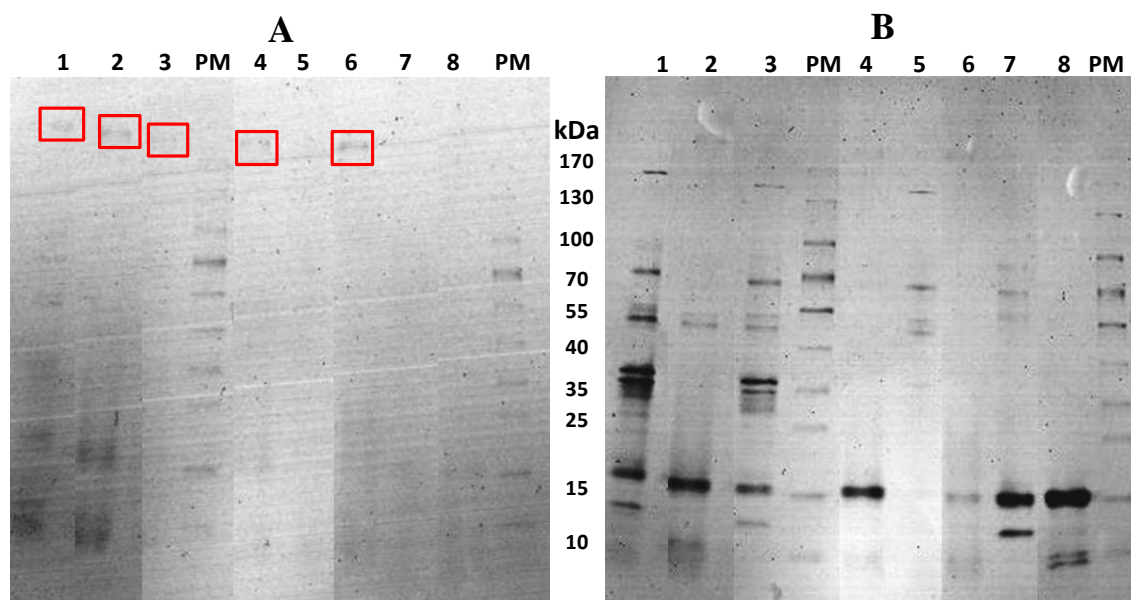
Existen varias diferencias en la composición proteica de las fracciones estudiadas respecto al proceso de extracción. La fracción butter serum es la más enriquecida en MFGM ya que consiste en la mazada retenida en la mantequilla. Por otro lado, el proceso de lavado del buttermilk y del MFGM reduce el contenido en proteínas contaminantes, referidas a las caseínas y proteínas del lactosuero, así como el rendimiento en la extracción de las proteínas de la MFGM. Además, el desnatado y la coagulación de las caseínas en la obtención del lactosuero reducen la concentración de

MFGM y aumentan la concentración en lactoferrina y otras proteínas solubles como la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactalbúmina, apreciándose una cierta cantidad de mucinas (Vanderghem *et al.*, 2010).

Las mucinas sólo pueden detectarse con la tinción PAS, como aparece reflejado en la figura 8. Así mismo, la lactadherina aparece con las dos variantes de glicosilación, PAS 6 y 7 con pesos moleculares de 50 y 47 kDa, respectivamente. La ausencia de lactadherina en el lactosuero podría deberse a la eliminación de la MFGM en el desnatado de la leche y/o a la agregación de esta proteína, si se ha liberado de la MFGM, con proteínas de lactosuero de menor tamaño al aumentar la temperatura de la leche desnatada en el proceso de coagulación de las caseínas (Singh, 2006).

## 1.2 Aislamiento de mucinas

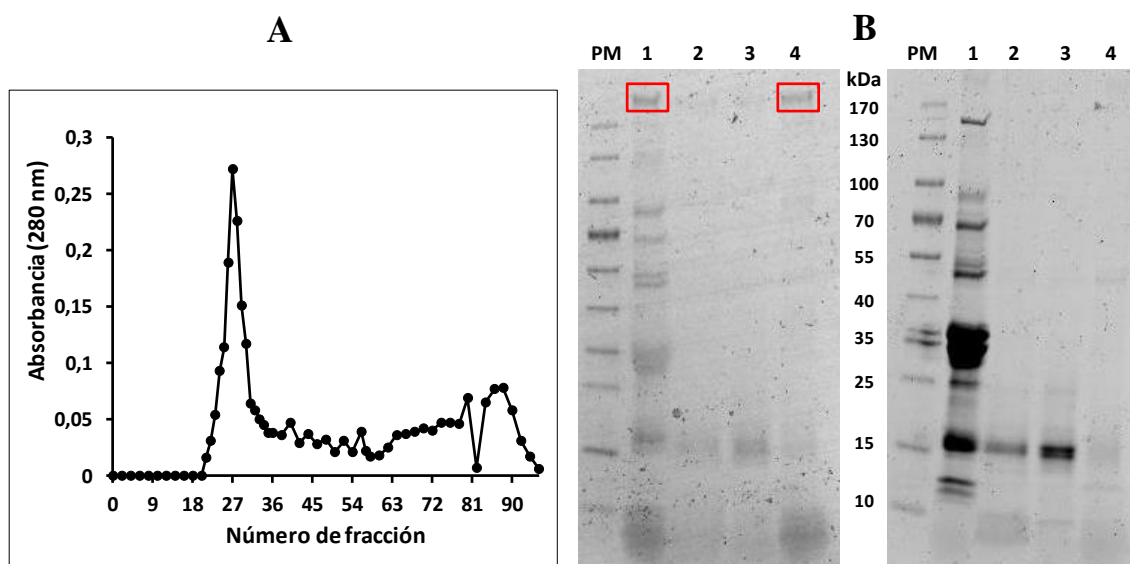
Las mucinas se aislaron de butter serum, buttermilk lavado y no lavado y lactosuero concentrado al doble, mediante hidrólisis con pepsina bovina (Fig. 9). Las fracciones de butter serum y buttermilk lavado y no lavado presentaron mayor concentración de mucinas que el lactosuero. Sin embargo, la fracción de butter serum tuvo mayor rendimiento en la extracción, por lo que se escogió para el aislamiento mediante una cromatografía de filtración en gel.



**Figura 9.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) del aislamiento de mucinas por hidrólisis de diferentes fracciones lácteas, teñidas con PAS (A) y azul de Coomassie (B). PM: Marcador de pesos moleculares. Butter serum (1), butter serum hidrolizado y concentrado x 2 (2), buttermilk no lavado (3), buttermilk no lavado hidrolizado y concentrado x 2 (4), buttermilk lavado (5), buttermilk lavado hidrolizado y concentrado x 2 (6), lactosuero (7) y lactosuero hidrolizado y concentrado x 2 (8). Las bandas correspondientes a las mucinas aparecen recuadradas en rojo.

La fracción de butter serum hidrolizada se aplicó a una columna de Sepharose CL-2B siguiendo el protocolo de Kodama y Kimura (2001) en un volumen de 1,5 mL y se obtuvo el perfil cromatográfico que se muestra en la figura 10A. El primer pico corresponde a la fracción de mucinas y presenta una cola en la que aparecen varios picos. Según Bansil y Turner (2006), la dificultad de separación de la mucina con otras proteínas podría deberse a la característica viscosa y a la tendencia a formar geles de esta proteína cuando se encuentra concentrada.

La fracción aislada de mucinas presenta una banda inferior (10B). Algunos autores como Holden *et al.* (1971) parecen asociarlo con la polidispersidad de esta proteína y al elevado número de glicanos de bajo peso molecular que tiene unidos. Además, las características de las mucinas como la polidispersidad, viscosidad y capacidad gelificante dificultan su aislamiento. En este trabajo fin de máster, se ha logrado purificar esta proteína con un alto grado de pureza.

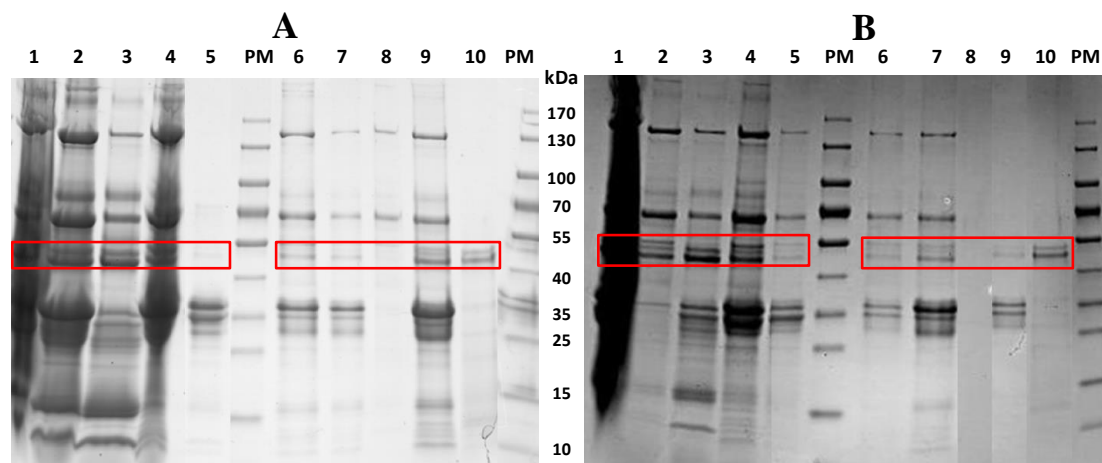


**Figura 10.** (A) Perfil cromatográfico en Sepharose CL-2B de la fracción concentrada del hidrolizado de butter serum con pepsina bovina. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 3 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones obtenidas, teñidas con PAS (izquierda) y azul de Coomassie (derecha). PM: marcador de pesos moleculares. Butter serum (1), hidrolizado de butter serum (2), fracción 86 (3) y fracción 27 (4). Las bandas correspondientes a las mucinas aparecen recuadradas en rojo.

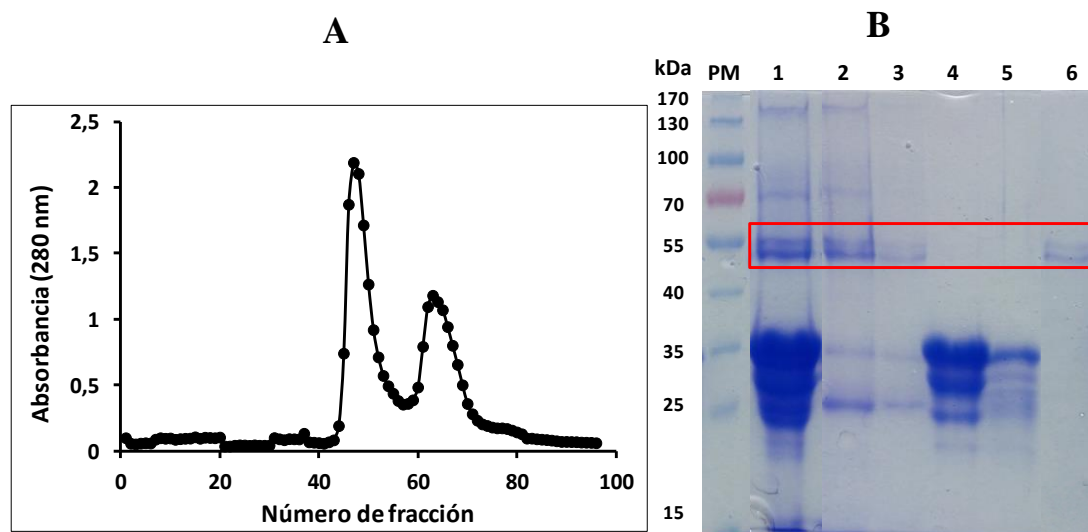
### 5.1.3 Aislamiento de una fracción enriquecida en lactadherina

La fracción enriquecida en lactadherina se aisló de una mezcla de butter serum con buttermilk lavado y no lavado siguiendo el protocolo de Kim *et al.* (1992). En la figura 11, se muestran las etapas de aislamiento que consistieron en la extracción de la MFGM y en dos centrifugaciones en una suspensión con NaCl, urea y KCl. La fracción

concentrada en urea y KCl obtenida de la mezcla de butter serum con mazada no lavada presentó mayor concentración en lactadherina y un mayor rendimiento de extracción. Así, esta fracción enriquecida en lactadherina se seleccionó para su aislamiento por cromatografía de filtración en gel.



**Figura 11.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7-10%) del aislamiento de lactadherina en las fracciones de MFGM obtenidas de la mezcla de butter serum con buttermilk no lavado (A) y buttermilk lavado (B) con tinción de azul de Coomassie. PM: Marcador de pesos moleculares. Butter serum (1), buttermilk (2), sobrenadante y precipitado obtenidos durante el proceso de extracción de la MFGM (3 y 4), sobrenadante y precipitado tras la centrifugación de la suspensión en NaCl (5 y 6), sobrenadante y precipitado tras la centrifugación de la suspensión en urea y KCl (7 y 8), sobrenadante en la suspensión en urea y KCl concentrado x 2 (9) y fracción de lactadherina pura (10). Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.



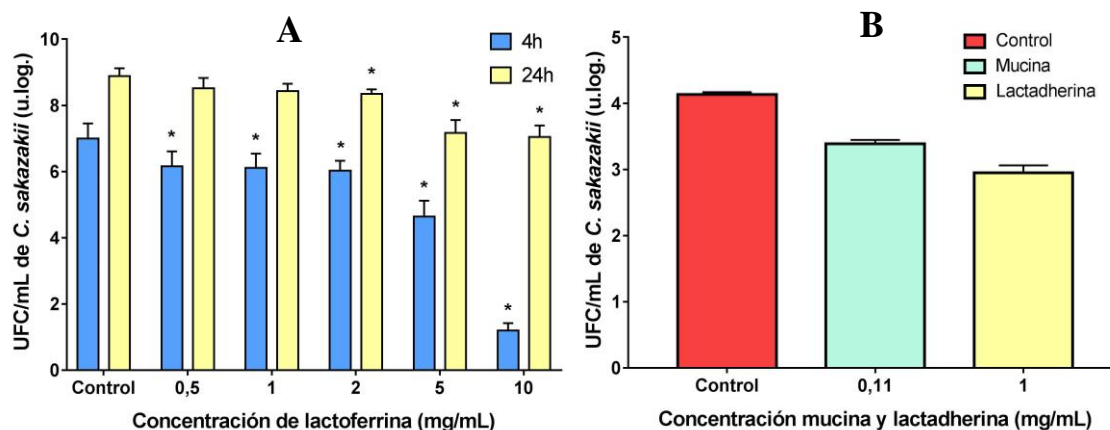
**Figura 12.** (A) Perfil cromatográfico en Sephacryl S-200 High Resolution de la fracción concentrada del aislamiento de lactadherina obtenido de la mezcla de butter serum con buttermilk no lavado. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 1,2 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7-10%) de las fracciones de la cromatografía teñidas con azul de Coomassie. PM: marcador de pesos moleculares. Fracción del aislamiento concentrada (1), fracción 47 (2), fracción 51 (3), fracción 63 (4), fracción 69 (5) y fracción de lactadherina pura (6). Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.



El cromatograma de la columna Sephacryl S-200 High Resolution presenta dos picos y se muestra en la figura 12A. La lactadherina se eluyó principalmente en el primer pico como se aprecia en la electroforesis (12B). Así, el aislamiento y la filtración en gel permiten eliminar gran parte de las proteínas contaminantes. Sin embargo, la fracción obtenida debe identificarse como enriquecida debido a que presenta pequeñas cantidades de otras proteínas (Kim *et al.*, 1992).

## 5.2 Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii*

La lactoferrina bovina nativa se ensayó en las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL con una concentración inicial de *C. sakazakii* de 4 u.log. incluyendo un control sin lactoferrina. Así mismo, las proteínas mucinas y lactadherina se analizaron a una concentración de 0,11 y 1 mg/mL, respectivamente. De esta manera, se determinó la actividad antibacteriana de la lactoferrina frente a *C. sakazakii* mediante recuento a las 4 y 24 h (Fig. 13A) y de las mucinas y lactadherina a las 4 h (Fig. 13B).



**Figura 13.** Ensayo de actividad antimicrobiana de lactoferrina bovina a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL con respecto a la concentración de *C. sakazakii* expresada en unidades logarítmicas a las 4 h (•) y a las 24 h (•) (A). Ensayo de actividad antimicrobiana de mucinas (•) y lactadherina (•) a las concentraciones de 0,11 y 1 mg/mL, respectivamente, expresados en u.log. a las 4 h. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos diferentes (n = 6) (A) y dos réplicas en un experimento (n = 2) (B). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*p < 0,001).

Los recuentos de *C. sakazakii* a las 4 h con 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL de lactoferrina disminuyeron significativamente con respecto al control hasta reducirse 5 u.log. en presencia de 10 mg/mL de esta proteína (Fig. 13A). De esta manera, se comprueba el efecto antimicrobiano de la lactoferrina. No obstante, la actividad antibacteriana de la lactoferrina a las 24 h parece reducirse al aumentar 2 y 7 veces la concentración del patógeno en las cantidades de 5 y 10 mg/mL de proteína, respectivamente, respecto a la incubación de 4 h. Según Harouna *et al.* (2015), la concentración y el tiempo de

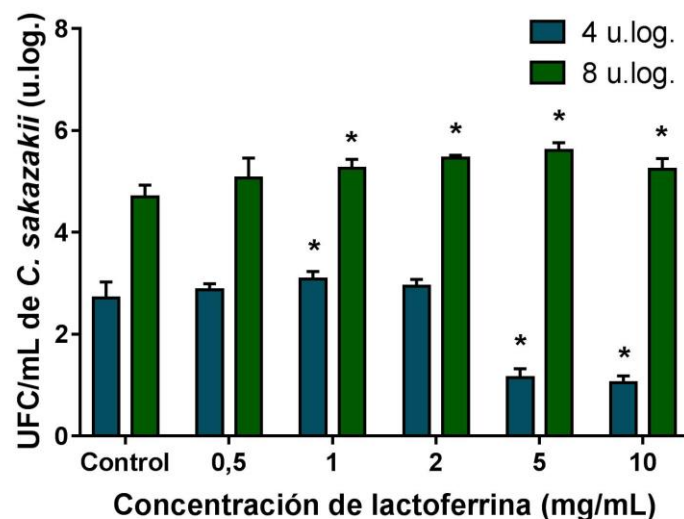
incubación del patógeno reducen la actividad antibacteriana de la lactoferrina, probablemente, debido a algún mecanismo de defensa de las bacterias.

La concentración de LPS en la lactoferrina comercial determinada por el kit de detección de endotoxinas fue de 0,08 unidades de endotoxina/mL (EU del inglés, *endotoxin units*) correspondiente aproximadamente a  $8 \times 10^{-6}$  µg/mL de LPS. La capacidad antibacteriana de la lactoferrina explica la unión de esta proteína con el LPS. Así, la detección de LPS en la lactoferrina comercial podría deberse a que la fuente de obtención es la leche que contiene una amplia diversidad de bacterias (Drago-Serrano *et al.*, 2012). Sin embargo, la cantidad de LPS detectada es baja y no afectaría a los ensayos realizados como se muestra posteriormente en la expresión de receptores.

Por otro lado, las mucinas y la lactadherina con un alto grado de pureza parecen reducir el crecimiento de *C. sakazakii*. Ross *et al.* (2015) identifica que las mucinas y la lactadherina tienen un efecto protector e inhibidor de la adhesión bacteriana. Sin embargo, no existen estudios que confirmen la actividad antimicrobiana de estas proteínas, sólo de la inhibición de la adhesión de patógenos. Así, se ha comprobado el efecto aislado en las mucinas y lactadherina. No obstante, sería necesario establecer un estudio sobre el efecto de la concentración de estas proteínas y confirmar con un número significativo de ensayos la capacidad antimicrobiana de las mucinas y la lactadherina.

### **5.3 Ensayos de inhibición de la adhesión bacteriana**

La inhibición de la adhesión de *C. sakazakii* se llevó a cabo con las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL de lactoferrina bovina nativa y un control (sin lactoferrina) en células Caco-2 cultivadas entre 7-10 días. Las concentraciones de partida del patógeno fueron de 4 y 8 u.log. y se incubaron durante 4 h con la proteína.

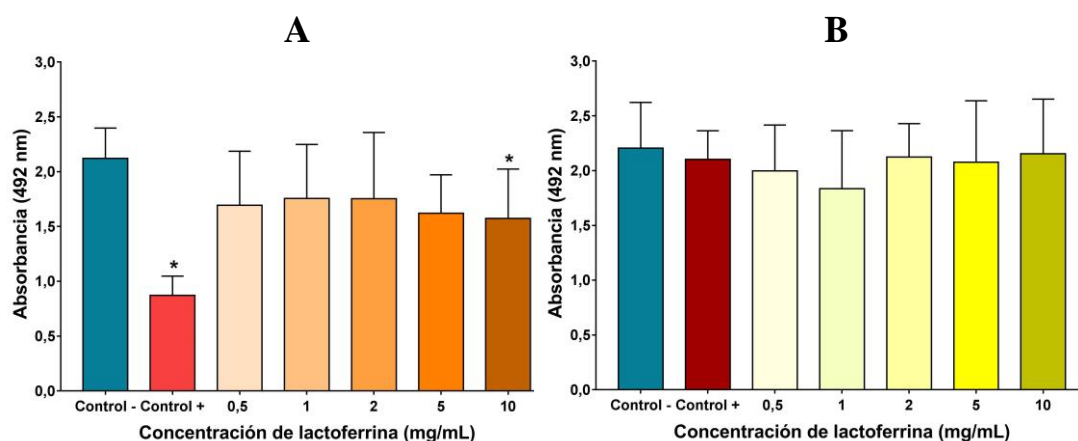


**Figura 14.** Ensayo de inhibición de la adhesión bacteriana de lactoferrina bovina a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL partiendo de las concentraciones iniciales de *C. sakazakii* de 4 (•) y 8 (•) unidades logarítmicas (u.log.) con respecto a la concentración de este patógeno a las 4 h y expresada en u. log. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos diferentes ( $n = 6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\* $p < 0,001$ ).

Las concentraciones de 5 y 10 mg/mL de la proteína presentaron diferencias significativas respecto al control a las 4 h para la concentración de 4 u.log. de *C. sakazakii* (Fig. 14). La mayor reducción fue de aproximadamente 2 u. log. para la lactoferrina a 10 mg/ml. Así, Quintero-Villegas, Wittke y Hutkins (2014) y este trabajo demuestran la inhibición de la adhesión de la lactoferrina en este patógeno. Además, la cantidad de *C. sakazakii* parece disminuir el efecto de inhibición de la adhesión de la lactoferrina al partir de una concentración mayor del patógeno como se observa a las concentraciones de 1, 2, 5 y 10 mg/mL de esta proteína. Jing *et al.* (2016) han identificado en *C. sakazakii* cepa ATCC BAA-894 la síntesis de un sideróforo, lo que posibilitaría la utilización del hierro unido a la lactoferrina por este patógeno para incrementar su crecimiento. Sin embargo, no existe evidencia de la capacidad de captación del hierro por la cepa de *C. sakazakii* estudiada (ATCC 29544), al relacionarse con una cepa poco invasiva (Giri *et al.*, 2012).

## 5.4 Determinación de la citotoxicidad

La citotoxicidad se determinó mediante la técnica del MTS en células Caco-2 con 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL de lactoferrina bovina nativa infectadas con *C. sakazakii*, utilizando como control células sin infectar (Fig. 15). Para ello, se siguió el mismo procedimiento descrito en los ensayos de inhibición de la adhesión.



**Figura 15.** Determinación de la citotoxicidad de la lactoferrina bovina a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL en células Caco-2, expresada en absorbancia (492 nm) y de un control positivo con 50 mM de peróxido de hidrógeno (A) y las mismas concentraciones de lactoferrina con una concentración de 4 u.log. de *C. sakazakii* a las 4 h (B). Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas en tres experimentos diferentes (n = 9). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (\*p < 0,001).

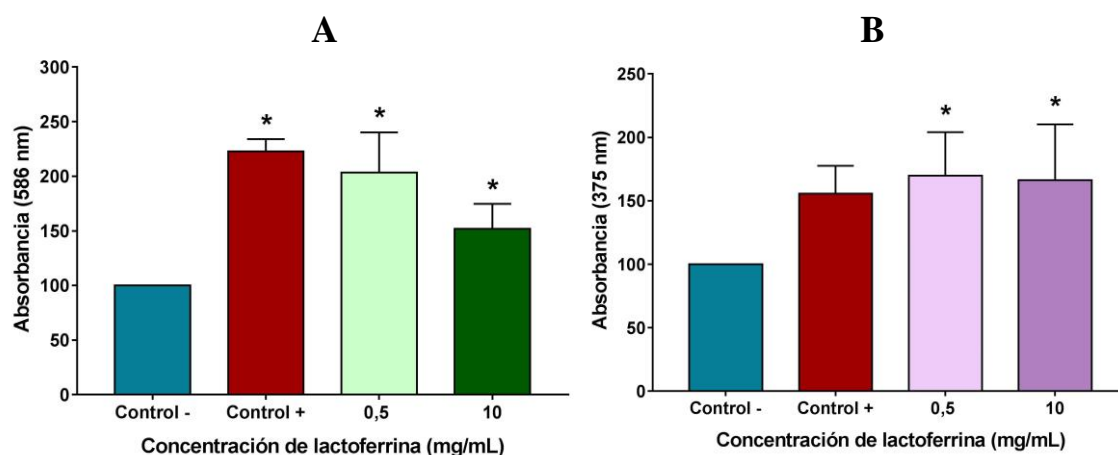
La lactoferrina bovina nativa no parece reducir la viabilidad celular, salvo a la concentración de 10 mg/mL en la que existe diferencia significativa respecto al control negativo (Fig. 15A). Sin embargo, el aumento de la citotoxicidad es ligero y difiere del control positivo con 50 mM de peróxido de hidrógeno. Este fenómeno se ha descrito por otros autores en concentraciones similares y superiores. La causa de la citotoxicidad de la lactoferrina puede deberse a su capacidad moduladora de la expresión génica en algunos componentes del ciclo celular. En consecuencia, reduciría el crecimiento de las células cancerosas y proporcionaría un efecto protector (Duarte *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2012).

Por otro lado, la adición de 4 u.log. *C. sakazakii* incubado durante 4 h a 37 °C no parece afectar a la viabilidad celular. Además, no existe evidencia de efecto sinérgico del patógeno con las altas o bajas concentraciones de lactoferrina. Según Almajed y Forsythe (2015), existen numerosas diferencias con respecto al daño celular infringido entre las cepas de este patógeno. La causa de la baja mortalidad celular puede deberse a la naturaleza poco invasiva de la cepa ATCC BAA-894.

## 5.5 Determinación del estrés oxidativo

La determinación de la viabilidad celular se completó con los ensayos de estrés oxidativo en células Caco-2 con 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina bovina nativa y una concentración inicial de 4 u.log. de *C. sakazakii*. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos de inhibición de la adhesión. Las células se despegaron del pocillo mediante raspado y se sonicaron. Después, se determinó el

contenido en proteínas y el estrés oxidativo de lípidos y proteínas con los protocolos mencionados anteriormente, obteniendo como resultado las gráficas que aparecen en la figura 16.



**Figura 16.** Determinación del estrés oxidativo en células Caco-2 tras la incubación con lactoferrina a las concentraciones de 0,5 y 10 mg/mL y un control positivo sin la proteína, a las que se les ha adicionado una concentración de 4 u.log. de *C. sakazakii* durante 4 h. La determinación del estrés oxidativo en lípidos (A) y en proteínas (B) se expresan en absorbancia a 586 y 375 nm, respectivamente. Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos diferentes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (\* $p < 0,001$ ).

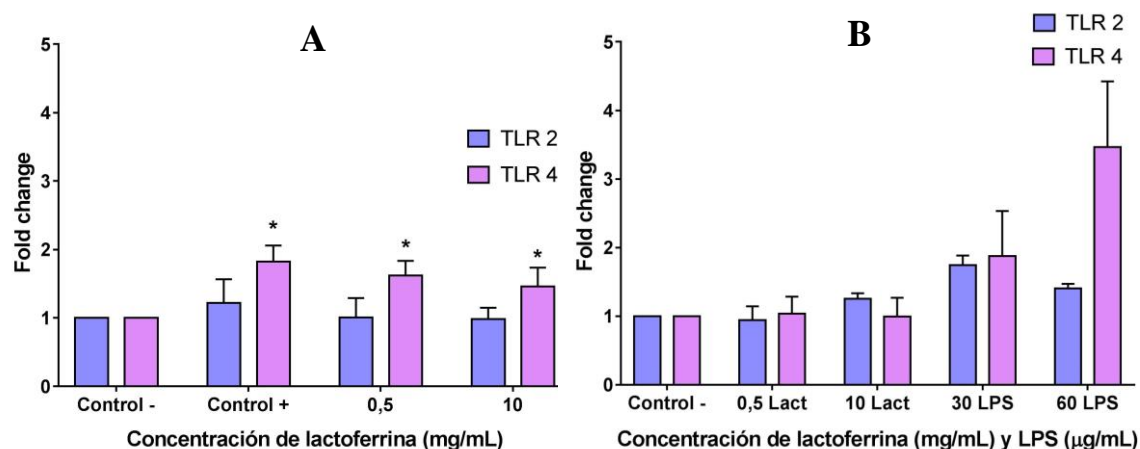
La concentración de la lactoferrina parece disminuir el estrés oxidativo de lípidos en las células infectadas con *C. sakazakii* como se muestra en la figura 16A. Sin embargo, el estrés oxidativo en proteínas causado por este patógeno aumenta ligeramente al adicionar lactoferrina.

Existen pocas evidencias sobre la determinación del estrés oxidativo en células infectadas con bacterias y la información se reduce a ensayos de inhibición de la adhesión con proteínas bioactivas como la lactoferrina. Según Dalle-Donne *et al.* (2003), el aumento de los carbonilos en proteínas se relaciona directamente con la reducción de la viabilidad celular y se ha relacionado con la patogénesis y la progresión de enfermedades.

## 5.6 Expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 mediante RT-PCR

La expresión de receptores TLR 2 y TLR 4 se determinó en células de Caco-2 con 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina e infectadas con 4 u.log. de *C. sakazakii* (Fig. 17A). Así, se comenzó extrayendo el RNA de las células, se transformó en cDNA mediante la técnica de retrotranscriptasa inversa y el cDNA obtenido se amplificó por PCR a tiempo real.

Además, se ensayaron cuatro controles correspondientes con 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina sin el patógeno y con 30 y 60 µg/mL de LPS sin proteína.



**Figura 17.** Expresión de receptores intestinales TLR 2 (•) y 4 (•) en células Caco-2 tras la incubación con lactoferrina a las concentraciones de 0,5 y 10 mg/mL y un control positivo sin la proteína a las que se les ha adicionado una concentración de 4 u.log. de *C. sakazakii* durante 4 h (A). Controles de 0,5 y 10 mg/mL de lactoferrina y 30 y 60 µg/mL de LPS sin el patógeno (B). La expresión de receptores se expresa en fold change. Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos diferentes (n = 6) (A) y dos réplicas en un experimento (n = 2) (B). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (\*p < 0,001).

La expresión del TLR 4 resulta ser mayor que la del TLR 2 (Fig. 17A). Figueroa-Lozano *et al.* (2018) relacionan la expresión del TLR 4 con la infección celular por bacterias. Además, estos autores exponen la capacidad de la lactoferrina para unirse al LPS de las bacterias y de modular la producción de TLR 4 debido a las glicanos presentes en esta proteína. La disminución de la sobreexpresión del TLR 4 al aumentar la concentración de lactoferrina puede ser debida al efecto inhibitor de la adhesión y antimicrobiano de la misma.

La ligera expresión de los receptores TLR 2 y 4 en los controles de lactoferrina sin la bacteria podría ser indicativa de la presencia de una pequeña cantidad de LPS unido a esta proteína (Fig. 17 B). Por otro lado, la elevada expresión de ambos receptores con las concentraciones de 30 y 60 µg/mL de LPS demuestra la respuesta defensiva de las células frente a agentes patógenos. De esta manera, se incrementaría la expresión y el efecto de los receptores al aumentar la concentración o el tiempo de incubación de las células con *C. sakazakii*.

## 6. Conclusiones

En este Trabajo de Fin de Máster se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Las fracciones lácteas butter serum y buttermilk son una fuente de gran interés para aislar las proteínas lactadherina y mucinas. La lactadherina se obtuvo como una fracción enriquecida a partir de una mezcla de butter serum y buttermilk, y las mucinas se aislaron con un alto grado de pureza a partir de butter serum.
2. La lactoferrina bovina comercial presentó actividad antibacteriana frente al patógeno emergente *C. sakazakii*. La actividad antibacteriana de esta proteína a las 4 h de incubación con el patógeno, fue mayor a las concentraciones de 5 y 10 mg/mL a las que se obtuvo una reducción de 5 unidades logarítmicas. Sin embargo, a las 24 h se revirtió el efecto bacteriostático, probablemente debido a algún mecanismo de defensa de las bacterias.
3. La fracción enriquecida en lactadherina y las mucinas presentaron actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii* a las concentraciones de 1 y 0,1 mg/mL, respectivamente, a las 4 h de incubación. No obstante, estos resultados son preliminares y requieren un estudio posterior.
4. La capacidad de inhibición de la lactoferrina bovina comercial en la adhesión de *C. sakazakii* a las células Caco-2 fue mayor a las concentraciones de 5 y 10 mg/mL de proteína, para la concentración de 4 u.log. de la bacteria a las 4 h de incubación. La reducción fue de aproximadamente dos unidades logarítmicas para la lactoferrina a 10 mg/ml.
5. La viabilidad y el estrés oxidativo de proteínas y lípidos en las células Caco-2 se determinó en los ensayos de inhibición de la adhesión de *C. sakazakii*. La viabilidad celular no se vio afectada al añadir el patógeno. Sin embargo, se observó un leve estrés oxidativo en proteínas.
6. Las vías de señalización del TLR 2 y TLR 4 se sobreexpresaron en las células Caco-2 en presencia de *C. sakazakii*, siendo mayor la del TLR 4. La mayor concentración de lactoferrina comercial ensayada, 10 mg/mL, tuvo un efecto protector reduciendo la expresión del TLR 4, probablemente debido a la inhibición que ejerce en la adhesión del patógeno a las células.

## 7. Referencias bibliográficas

- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10, 131-144.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 457-468.
- Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). (2011). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments. "Cronobacter spp.". Accedido por última vez: 15/08/2018. Web: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2000sa0003Fi.pdf>
- Almajed, F. S., Forsythe, S. J. (2015). *Cronobacter sakazakii* clinical isolates overcome host barriers and evade the immune response. *Microbial Pathogenesis*, 90, 55-63.
- Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Elabedeen, N. A. Z., Jaradat, Z. W., Shaker, R. R., Kheirallah, K. A., Tarazi, Y. H., Holley, R. A. (2011). Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. *International Journal of Microbiology*, 146, 137-143.
- Bansil, R., Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 164-170.
- Boland, M. (2011). Whey proteins. En: Phillips, G. O., Williams, P. A. (Eds), *Handbook of food proteins* (páginas: 34-38). Massey, New Zealand: Woodhead Publishing Limited.
- Chen, Q., Zhu, Y., Qin, Z., Qiu, Y., Zhao, L. (2018). *Cronobacter* spp., foodborne pathogens threatening neonates and infants. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 5, 330-339.
- Codex Alimentarius. (1999). Norma del Codex para el uso de términos lecheros (CODEX STAN 206-1999).
- Craven, H. M., McAuley, C. M., Duffy, L. L., Fegan, N. (2010). Distribution, prevalence and persistence of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in the nonprocessing and processing environments of five milk powder factories. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1044-1052.



- Dalgleish, D. G., Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449-467.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., Camp, J. V. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457.
- Drago-Serrano, M. E., De la Garza-Amaya, M., Serrano, J., Campos-Rodríguez, R. (2012). Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International Immunopharmacology*, 12, 1-9.
- Duarte, D. C., Nicolau, A., Teixeira, J. A. Rodrigues, L. R. (2011). The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *Journal of Dairy Science*, 94, 66-76.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2004). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal*, 113, 1-35.
- Farrel, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M., Qi, P. X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 135-147.
- Fei, P., Jiang, Y., Jiang, Y., Yuan, X., Yang, T., Chen, J., Wang, Z., Kang, H., Forsythe, S. J. (2017). Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula collected from chinese retail markets. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-9.
- Figuerola-Lozano, S., Valk-Weeber, R. L., Van Leeuwen, S. S., Dijkhuizen, L., De Vos, P. (2018). Dietary N-glycans from bovine lactoferrin and TLR modulation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62, 1-30.
- Fiore, A., Casale, M., Aureli, P. (2008). *Enterobacter sakazakii*: epidemiology, clinical presentation, prevention and control. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, 44, 275-280.
- Food Safety Authority of Ireland (FSAI). (2011). *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Microbial Factsheet Series*, 1, 1-5.

- Fox, P. F., Kelly, A. L. (2007). Chemistry and biochemistry of milk constituents. En: Hui, Y. H. (Ed), *Food biochemistry and food processing* (páginas 425-430). Iowa, EE.UU.: Blackwell Publishing.
- Gallier, S., Laubscher, A., Jiménez-Flores, R. (2014). The milk fat globule membrane: Structure, methodology for its study, and functionality. En: Boland, M., Golding, M., Singh, H. (Eds), *Food structures, digestion and health* (página 109). California, CA, EE. UU.: Elsevier Inc.
- García-Montoya, I. A., Siqueiros, T., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 226-236.
- Giri, C., Shima, K., Tall, B. D., Curtis, S., Sathyamoorthy, V., Hanisch, B., Kim, K. S., Kopecko, D. J. (2012). *Cronobacter* spp. (previously *Enterobacter sakazakii*) invade and translocate across both cultured human intestinal epithelial cells and human brain microvascular endothelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 52, 140-147.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 1-8.
- Guan, R., Ma, J., Wu, Y., Lu, F., Xiao, C., Jiang, H., Kang, T. (2012). Development and characterization of lactoferrin nanoliposome: cellular uptake and stability. *Nanoscale Research Letters*, 7, 1-6.
- Gurtler, J. B., Kornacki, J. L., Beuchat, L. R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 1-34.
- Hansen, C. L., Cheong, D. Y. (2007). Agricultural waste management in food processing. En: Kutz, M. (Ed), *Handbook of farm dairy and food machinery* (páginas: 609-661). Norwich, NY: EE.UU: William Andrew Publishing.
- Harouna, S., Carramiñana, J. J., Navarro, F., Pérez, M. D., Calvo, M., Sánchez, L. (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment. *Food Control*, 47, 520-525.
- Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L., Riedel, K. (2010). Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2251-2261.

- Haschke, F., Haiden, N., Thakkar, S. K. (2016). Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 69, 17-26.
- Haug, A., Høstmark, A. T., Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition - a review. *Lipids in Health and Disease*, 6, 1-16.
- He, Y., Lawlor, N. T., Newburg, D. S. (2016). Human milk components modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. *Advances in Nutrition*, 7, 102-111.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Callanan, J. J., Fanning, S. (2010). *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 339-350.
- Holden, K. G., Yim, N. C. F., Griggs, L. J., Weisbach, J. A. (1971). Gel electrophoresis of mucous glycoproteins. I. Effect of gel porosity. *Biochemistry*, 10, 3105-3109.
- Hvarregaard, J., Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T., Petersen, T. E. (1996). Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *European Journal of Biochemistry*, 240, 628-636.
- International Network of Food Safety Authorities (INFOSAN). (2005). *Enterobacter sakazakii* en las formulas infantiles en polvo. Nota informativa N° 1/2005. Accedido por última vez: 17/08/2018. Web:  
[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_01\\_Esakazakii\\_Jan05\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_Esakazakii_Jan05_sp.pdf)
- Jung, J.-H., Choi, N.-Y., Lee, S.-Y. (2013). Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiology*, 34, 70-80.
- Kelly, A. L. (2010). Milk biochemistry. En: Griffiths M. W. (Ed), *Improving the safety and quality of milk. Volume 1: Milk production and processing* (páginas: 3-4). New York, NY: EE. UU.: Woodhead Publishing Limited y CRC Press LLC.
- Kim, D.H., Kanno, C., Mizokami, Y. (1992). Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1122, 203-211.
- Kim, K., Kim, K.-P. Choi, J., Lim, J.-A., Lee, J., Hwang, S., Ryu, S. (2010). Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5188-5198.
- Kodama, Y., Kimura, N. (2004). Inhibitor of *Helicobacter pylori* colonization. Ghen Corporation. Número de patente: 6235709.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TL. *Nature*, 227, 680-685.

- Liu, B., Newburg, D. S. (2013). Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeeding Medicine*, 8, 354-362.
- Liu, C., Erickson, A. K., Henning, D. R. (2005). Distribution and carbohydrate structures of high molecular weight glycoproteins, MUC1 y MUCX, in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 88, 4288-4294.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.
- O'Regan, J., Ennis, M. P., Mulvihill, D. M. (2009). Milk proteins. En: Phillips, G. O., Williams, P. A. (Eds), *Handbook of hydrocolloids, Second Edition* (páginas: 301-303). Cork, Ireland: Woodhead Publishing Limited.
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., Hickey, R. M. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, 24, 220-236.
- Park, Y. W., Nam, M. S. (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35, 831-840.
- Quintero-Villegas, M. I., Wittke, A., Hutkins, R. (2014). Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by lactoferrin. *Current Microbiology*, 69, 574-579.
- Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DO núm. 139, de 30 de abril de 2004).
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (DOUE núm. 338, de 22 de diciembre de 2005).
- Ross, S. A., Lane, J. A., Kilcoyne, M., Joshi, L., Hickey, R. (2015). The milk fat globule membrane: A potential source of health-promoting glycans. En: Gupta, V. K., Tuohy, M. G., Lohani, M., O'Donovan, A. (Eds), *Biotechnology of bioactive compounds: source and applications* (páginas 631-633). West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Shi, J., Heegaard, C. W., Rasmussen, J. T., Gilbert, G. E. (2004). Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667, 82-90.
- Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane-A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 154-163.

- Singh, N., Goel, G., Raghav, M. (2017). Insights into virulence factors determining the pathogenicity of *Cronobacter sakazakii*. *Virulence*, 6, 433-440.
- Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88, 2289-2294.
- Strydom, A., Cawthorn, D.-M., Cameron, M., Witthuhn, R. C. (2012). Species of *Cronobacter*- A review of recent advances in the genus and their significance in infant formula milk. *International Dairy Journal*, 27, 3-12.
- Swaigood, H. E. (2010). Las características de la leche. En: Damodaran, S., Parkin, K. L., Fennema, O. R. (Eds), *Química de los alimentos, tercera edición* (páginas 895-902). Zaragoza, España: Editorial Acribia S. A.
- U. S. Food and Drug Administration, FDA. (2012). *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*. En: Lampel, K. A., Al-Khaldi, S., Cahill, S. M (Eds), *Bad bug book, Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, Second Edition* (páginas 50-53). Createspace independent publishing platform.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14, 485-500.
- Walstra, P. (1999). Casein Sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal*, 9, 189-192.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. (2006). Milk: Main characteristics. En: Barbosa-Cánovas, G. V., Davidson, P. M., Dreher, M., Hartel, R. W., Juneja, L. R., Karel, M., Labbe, R. G., Lund, D. B., Min, D. B., Nollet, L. M., Salminen, S., Steele, J. L., Thorngate, J. H., Walstra, P., Whitaker, J. R., Yada, R. Y. (Eds), *Dairy Science and Technology, Second Edition* (páginas: 3-4). Florida, FL: EE. UU.: Taylor & Francis Group, LLC.
- Xing, C., Du, X.-J., Li, P., Wang, S. (2016). Transcriptome analysis of *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 after interaction with human intestinal epithelial cell line HCT-8. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 311-322.
- Zeng, M. Y., Inohara, N., Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*, 10, 18-26.